

Aus dem Institut für Zuchthygiene der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. K. Zerobin)

**RADIOIMMUNOASSAY (RIA)
FÜR
PORCINES LUTEINISIERUNGSHORMON (pLH)**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

KLAUS KARLOVICH

Tierarzt

von Wittenbach (SG) und Bogotá (Kolumbien)

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. K. Zerobin, Referent

Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Korreferent

aku-Fotodruck Zürich

1982

Aus dem Institut für Zuchthygiene der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. K. Zerobin)

**RADIOIMMUNOASSAY (RIA)
FÜR
PORCINES LUTEINISIERUNGSHORMON (pLH)**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

KLAUS KARLOVICH

Tierarzt

von Wittenbach (SG) und Bogotá (Kolumbien)

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. K. Zerobin, Referent

Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Korreferent

aku-Fotodruck Zürich

1982



ALICIAE TIHAMEROQUE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhalt

1.	Einleitung	7
2.	Problemstellung	12
2.1.	Markierung von porcinem LH mit ^{125}I	12
2.2.	Antiserum gegen Schweine-LH	14
2.3.	Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon	15
2.4.	Inkubationsbedingungen	15
2.5.	Gültigkeit, Wert oder Aussage des Bestimmungsverfahrens	16
3.	Herstellung, Reinigung und Prüfung des markierten Antigens ("Tracer")	17
3.1.	Wahl des Antigens	17
3.2.	Wahl der Methode	17
3.3.	Prinzip und Anforderungen der Chloramin-T-Methode	17
3.4.	Markierungsprozedere	21
3.5.	Reinigung des Originals	22
3.6.	Immunreaktivität der Einzeleluate	23
3.7.	Spezifische Aktivität	26
3.8.	Diskussion der erarbeiteten Methoden	28
4.	Antiserum gegen pLH - Erster Antikörper - Anti-pLH	
4.1.	Immunogen	30
4.2.	Serumtiere	30
4.3.	Immunisierungsverfahren	30
4.4.	Blutentnahme und Serumgewinnung	31
4.5.	Bestimmung des Antikörpertiters	33
4.6.	Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur	37
4.7.	Spezifität des Antikörpers gegen porcines LH	39
4.8.	Diskussion	42

5.	Immunpräzipitation	45
5.1.	Arbeitsübersicht	45
5.2.	Isolierung der Immunglobuline	46
5.3.	Produktion des Zweiten Antikörpers, ARGG	48
5.4.	Qualitative Prüfung der ARGG-Seren	50
5.5.	Quantitative Prüfung der ARGG-Seren	51
5.6.	Inkubationsbedingungen	53
5.7.	Diskussion	55
6.	Standard und Standardkurve	57
6.1.	Prinzip	57
6.2.	Inkubationsprogramm	57
6.3.	Ergebnisse und Diskussion	58
6.4.	Vorinkubation	61
6.5.	Serumeffekt	61
7.	Inkubationsprozedere im Routineverfahren	65
8.	Gültigkeit, Wert oder Aussage des Bestimmungsverfahrens	70
8.1.	Empfindlichkeit (Sensitivity)	70
8.2.	Genauigkeit (Accuracy)	70
8.3.	Präzision (Precision)	72
9.	Anwendungsbeispiel	75
10.	Zusammenfassung	80
11.	Literatur	82
12.	Anhänge:	
	Anhang 1: Puffer - Zusammensetzung - Herstellung	88
	Anhang 2: Reagenzien - Zusammensetzung - Herstellung	90
	Anhang 3: Laborhilfsmittel - Apparate	93

1. Einleitung

Luteinisierungshormon (Luteinisierendes Hormon, LH oder ICSH = Interstitial Cell Stimulating Hormone) spielt als hypophysäres Gonadotropin auch im Fortpflanzungsgeschehen des Schweines eine übergeordnete Rolle. Für die Erfassung arteigener Besonderheiten seines quantitativen und zeitlichen Auftretens in intra- und extrazellulären Räumen und seiner Interaktionen mit anderen Fortpflanzungshormonen ist eine genaue, spezifische und reproduzierbare Methode zur Bestimmung von porcinem LH unerlässlich. Erst dadurch werden Reihenuntersuchungen möglich, um beim weiblichen wie beim männlichen Schwein den Verlauf der LH-Konzentration sowohl unter normophysiologischen Bedingungen als auch bei Reproduktionsstörungen zu studieren:

- Beim weiblichen Schwein interessieren unter anderem die zeitliche Beziehung zwischen maximaler LH-Ausschüttung und Ovulation bei spontaner und induzierter Rausche, LH-Serumspiegel in der Spätgravidität, während der Laktation, nach dem Absetzen der Ferkel und nicht zuletzt beim postpartalen Oestrus (23). Aus dem Vergleich solcher Befunde mit Erhebungen bei pathophysiologischen Zuständen (Ovulationsstörungen, Zystenbildung) könnten Rückschlüsse auf deren Pathogenese gezogen oder gar Hinweise auf eine Therapie abgeleitet werden.
- Da ICSH beim männlichen Tier in direkter Beziehung zu den Leydigischen Zwischenzellen und damit zur Testosteronproduktion steht, ist seine quantitative Erfassung, insbesondere in Verbindung mit Testosteronbestimmungen, wünschenswert. Diesbezügliche Fragestellungen sind sowohl bei Mast- als auch bei Zuchtebern denkbar, denn diese Parameter könnten gegebenenfalls als Selektionskriterien dienen.

Die Problematik einer quantitativen Nachweismethode, welche den eingangs erwähnten Anforderungen genügt, beruht weitgehend auf den biochemischen Gegebenheiten des LH. Beim porcinen LH handelt es sich um ein Glykoprotein (Kohlehydratanteil 5-26%) mit einem MG von ca. 30'000, das in basophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet und gespeichert wird (39). Wie die beiden anderen Glykoproteine des Hypophysenvorderlappens - FSH und TSH - besteht es aus zwei verschiedenen Untereinheiten (α - und β -Kette), die von nichtkovalenten Kräften zusammengehalten werden.

- Die α -Kette ist bei allen drei Hormonen innerhalb der gleichen Spezies identisch ("alpha = artspezifisch"), unterscheidet sich jedoch von Art zu Art, was durch immunologische Kreuzreaktionen in Untersuchungen mit isolierten Untereinheiten nachgewiesen wurde (3,27,61).
- Die β -Kette ist innerartlich bei allen drei genannten Hormonen verschieden; sie ist Informationsträger für die biologische Wirkung des betreffenden Glykoproteins ("beta = biologisch"). Zwischen den einzelnen Spezies sind die β -Ketten eines Hormons zwar nicht identisch, einander aber doch ähnlich: Ein Hormon löst in einem artfremden Individuum ebenfalls die ihm eigene biologische Wirkung aus (biologische Kreuzreaktion). Die biologischen Potenzen variieren allerdings von Tierart zu Tierart in quantitativer Hinsicht (13,37).

Dieser komplexen Situation ist Rechnung zu tragen, wenn die möglichen Nachweismethoden (Tab. 1) beurteilt und deren Ergebnisse interpretiert werden sollen:

- In vivo-Bioassays basieren auf der Beobachtung eines biologischen Effekts, der allerdings nicht nur durch die alleinige Wirksamkeit des fraglichen Hormons zustandekommt. Geringe Empfindlichkeit, Spezifität und Genauigkeit sowie die Anforderungen an die Versuchstiere schliessen dieses Bestimmungsprinzip für Reihenanalysen aus (62).

Tab. 1: Verschiedene Nachweismethoden für LH

	Bezeichnung	Versuchstiere bzw. Testsubstrat	Reaktion bzw. Testparameter	Lit.
in vivo Bioassay	OAAD (Ovaraskorbinsäuretest / Ovarian Ascorbic Acid Depletion)	Unreife, intakte Rattenweibchen, pseudogavid nach HCG und PMSG	Abnahme des Askorbinsäuregehaltes in den Ovarien	4
	---	Praepuberale Rattenweibchen	Zunahme des ovariellen Blutflusses	2
	---	Unreife Rattenweibchen	Bildung von C.L. in den Ovarien	28
	VPW Ventral Prostata Weight	Unreife hypophysektomierte Rattenmännchen	Gewichtsanstieg der ventralen Prostata	11,18
	---	Unreife hypophysektomierte Rattenmännchen	Gewichtszunahme der Samenblase	11,18
in vitro Bioassay	---	Unreife männliche Ratten mit Colchizin vorbehandelt	Zunahme der Mitoserate in den Samenblasen	42
	RICT (Rat Interstitial Cell Testosterone) bzw. MICT (Mouse Interstitial Cell Testosterone)-Assay	Kultur Leydigischer Zwischenzellen von Ratten bzw. Mäusen	Radioimmunologische Messung der Testosteronproduktion	13,45, 63
	RRA (Radioligand Receptor Assay)	Isolierte LH-Rezeptoren Leydigischer Zwischenzellen bzw. Lutealzellen oviner Gelbkörper	Messung der Reaktion des markierten Hormons mit dem spezifischen Rezeptor	8,9, 32,34, 35
in vitro Assay	RIA (Radioimmunoassay) EIA (Enzymimmunoassay)	hochspezifische Antiseren	Erfassung der immunologischen Reaktion zwischen Hormon und Antikörper	41,46, 48,49, 52,53, 65

- In vitro-Bioassays besitzen hohe Spezifität und Genauigkeit.
 - . Im RICT- (Rat Interstitial Cell Testosterone-) und MICT- (Mouse Interstitial Cell Testosterone-) Assay (13,45,63) wird die durch Standard Dosen und Testproben stimulierte Testosteronproduktion Leydigischer Zwischenzellen radioimmunologisch gemessen und lässt sich deshalb auf Luteinisierungshormone aller Säugetierspezies anwenden. Seine Resultate geben exakte Hinweise auf jene Hormonmengen, die tatsächlich biologisch wirksam sind.
 - . Der Rezeptor-Assay ist ein modifizierter CPB- (Competitive Protein Binding) Assay und misst die an Rezeptoren gebundenen Hormonmengen; gegenwärtig ist noch nicht restlos abgesichert, inwieweit der gebundene Anteil die biologische Wirksamkeit wiedergibt und ob die anfänglich für hochspezifisch angesehenen Rezeptoren ausschliesslich mit dem fraglichen Hormon Komplexe eingehen (8,9,12,32,34,35).

Beide Verfahren kommen wegen der subtilen Aufbereitung des biologischen Substrates für das Routinelabor nicht in Betracht; für besondere Fragestellungen sind es jedoch zweifelsohne indizierte Methoden und auch zur Verarbeitung zahlreicher Proben geeignet.

- In den immunologischen in vitro-Assays wird das immunreaktive Hormon mit der bislang höchsten Spezifität, Genauigkeit und Empfindlichkeit quantitativ erfasst. Zwangsläufig stellt sich die Frage nach der Uebereinstimmung von biologischer Aktivität und Immunreaktivität des Hormonmoleküls.

Untersuchungen bei weiblichen Rhesusaffen zeigten, dass die mit RICT und RIA ermittelten LH-Konzentrationen im fortpflanzungsfähigen Alter übereinstimmten. Signifikante Unterschiede ergaben sich vor und während der Pubertät sowie nach Ovariectomie. Die Diskrepanz zwischen den beiden Aktivitäten könnte ihre Ursache in der Synthese verschiedener LH-Formen haben; jedenfalls unterscheiden sich die LH-Moleküle vor Eintritt der Geschlechtsreife und nach der Kastration von jenen während der Reproduk-

tionphase in ihrem Gehalt an Kieselsäure (45,64). Darüber hinaus sind wie bei Insulin und ACTH (16,68) mindestens beim Menschen auch sog. "Big and Little Forms" von LH bekannt und werden vorläufig als Vorstufen der Synthese angesehen.

Das Prinzip des RIA (Radioimmunoassay) und des EIA (Enzyme Immunoassay) und ihrer vielfältigen Modifikationen besteht in der Konkurrenz des markierten und nicht-markierten Antigens um die Bindungsstellen an einem hochspezifischen Antikörper (siehe auch Abb. 1). In Bezug auf die immunologische Selektionierungspotenz stehen beide Verfahren zusammen an oberster Stelle bisher bekannter Bestimmungsmethoden. Beim EIA wird das eine Antigen durch Koppelung des Moleküls an ein Enzym gekennzeichnet, dessen Reaktion mit einem vorgegebenen Substrat photometrisch gemessen wird; diese Manipulation am Molekül kann zu Einbussen in der Empfindlichkeit führen. Im RIA wird das Antigen durch Einbau eines radioaktiven Isotops markiert. Die hohe spezifische Aktivität (Isotopenreinheit) der heute verfügbaren Radioisotope sowie die hohe spezifische Aktivität (Radioaktivität/Hormonmolekül), die nach geeigneter Markierung erzielt werden kann, führen dazu, dass der RIA hinsichtlich Empfindlichkeit dem EIA überlegen ist (6,32). EIA und RIA sind deswegen keineswegs Konkurrenten; über den Einsatz des einen oder des anderen Verfahrens entscheiden die Anforderungen, die an das Messverfahren gestellt werden müssen, und diese wiederum sind vom Konzentrationsbereich der fraglichen Substanz her gegeben.

Der Gehalt an hypophysären Gonadotropinen im peripheren Kreislauf bewegt sich bei allen Haustieren je nach Reproduktionsphase und Tierart zwischen 100 pg und 100 ng pro ml Blutserum. Im Bestreben, mit der Bestimmung von porcinem LH auch in kleinen Probest volumina den ganzen Konzentrationsbereich abzudecken, haben wir uns für die Erstellung eines Radioimmunoassays entschieden.

2. Problemstellung

Der Radioimmunoassay (RIA) wurde erstmals 1959 von Rosalyn S. Yalow und Solomon A. Berson (66,67) zum quantitativen Nachweis humanen Insulins beschrieben. In der Folgezeit wurden analoge Verfahren für eine Vielfalt von Wirkstoffen hormonaler und nicht-hormonaler Art (Eiweiss- und Steroidhormone, Drogen, Antibiotika u.a.m.) entwickelt. Obwohl sie alle auf dem gleichen Grundprinzip basieren, muss für jede Verbindung eine spezifisch auf das zu messende Molekül abgestimmte Methodik erarbeitet und überprüft werden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Radioimmunoassay für Schweine-LH zu entwickeln - für ein Molekül also, zu dessen immunologischer Bestimmung die erforderlichen Agenzien weder als ganzer Kit noch einzeln im Handel erhältlich sind. In dieser Ausgangssituation ergaben sich die nachgenannten Einzelprobleme, die sich aus dem in Abb. 1 dargestellten Schema ableiten lassen.

1. Markierung von porcinem LH mit ^{125}I

Beim Einbau von Radioisotopen in Eiweissmoleküle werden zwei Ziele verfolgt. Einerseits soll eine Spezifische Aktivität (Radioaktivität / Molekül) erreicht werden, die eine maximale Zählgenauigkeit bei minimaler Messdauer ermöglicht. Andererseits soll der Anteil der dabei entstehenden Nebenprodukte gering gehalten werden.

In der Reihe möglicher Radioisotopen bietet sich im ^{125}Jod (^{125}I) ein Nuklid an, das sowohl als Halogen leicht in die Eiweissstruktur eingebaut als auch dank seiner hohen Zerfallsfrequenz den Anforderungen der Zählstatistik optimal genügen kann. Darüber hinaus verlangt es als reiner Gamma-Emitter keine aufwendige Probenvorbereitung für die Radioaktivitätsmessung.

Es galt deshalb abzuklären, ob mit der technisch einfachen Chloramin T-Methode nach Greenwood, Hunter und Glover (17) im Falle von Schweine-LH beide Zielvorstellungen der Markierung - ausreichende Spezifische Aktivität und geringe Schädigung des Hormons - erfüllt werden können.

Abb. 1: Prinzip des RIA



Markiertes und unmarkiertes Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. $[\text{Ag}^*]$ und $[\text{Ak}]$ werden konstant gehalten. Bei zunehmenden Mengen unmarkierten Antigens werden die Bindungsstellen am Antikörper vermehrt durch unmarkiertes Antigen besetzt, so dass sich die Aktivität im Antigen-Antikörper-Komplex in Abhängigkeit von der Standardmenge verringert.

Die Beziehungen zwischen den einzelnen Standarddosen (Abszisse) und der dadurch bedingten Aktivitäten im Antigen-Antikörper-Komplex (Ordinate) werden graphisch als sog. Standardkurve dargestellt. Umgekehrt kann anhand der Standardkurve der antikörpergebundenen Aktivität einer unbekannten Testprobe die darin enthaltene Hormonmenge zugeordnet werden.

2. Antiserum gegen Schweine-LH

Der Gewinnung von Antiserum gegen porcines LH geht eine Stimulation der Antikörperbildung in einem artfremden Organismus voraus. An das Immunisierungsverfahren selbst stellten wir die folgenden Anforderungen:

- 1) Mit einem minimalen Aufwand an Material (Labortiere, Immunogen) und Zeit soll die Antikörperbildung stimuliert werden.
- 2) Die erforderlichen Manipulationen dürfen die Labortiere möglichst wenig beeinträchtigen.
- 3) Endziel der Immunisierung soll ein in jeder Hinsicht hochwertiges Antiserum sein.

Das Problem konnte deshalb wie folgt formuliert werden: Mit einem sorgfältig ausgewählten Immunisierungsverfahren soll bei geeigneten Labortieren die Produktion von Antikörpern angeregt werden, die den Ansprüchen eines Radioimmunoassays (Titer, Spezifität, Empfindlichkeit) zu genügen vermögen.

3. Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon

Wenn die Reaktion zwischen markiertem Antigen, unmarkiertem Antigen und Antikörper ein Gleichgewicht erreicht hat, muss der Antigen-Antikörper-Komplex vom freien, an der Immunreaktion nicht beteiligten Hormon getrennt werden; dazu stehen zahlreiche und - von ihrem Prinzip her - vielfältige Verfahren zur Verfügung. Die Anforderungen an die ideale Methode lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Saubere Trennung von freiem und gebundenem Hormon.
- Keine Beeinflussung durch Serum- oder andere unspezifische Komponenten im Inkubationsgemisch.
- Rasche und einfache Durchführung.
- Hohe Reproduzierbarkeit.
- Niedrige Kosten.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien entschieden wir uns für die I m m u n p r ä z i p i t a t i o n des gebildeten Hormon-Antikörper-Komplexes (Doppelantikörper-Methode, Double Antibody Technique). Ihr Prinzip besteht darin, dass der unter Inkubationsbedingungen entstehende lösliche Hormon-Antikörper-Komplex nach Zugabe eines sog. Zweiten Antikörpers, der gegen den Ersten Antikörper gerichtet ist, als unlöslicher Immunkomplex präzipitiert wird. Um die Präzipitationsbedingungen zu optimieren, wird dem Reaktionsgemisch Nicht-Immunserum jener Spezies zugesetzt, von welcher der Erste Antikörper gewonnen wird.

Für die Durchführung dieser Immunpräzipitation stellten sich die folgenden Probleme:

- 1) Von jener Tierart, bei welcher der Erste Antikörper gewonnen wird, sind Immunglobuline zu isolieren.
- 2) In einer geeigneten Tierspezies ist mittels eines geeigneten Immunisierungsverfahrens die Bildung von Antikörpern gegen die isolierten Immunglobuline zu stimulieren.
- 3) Das gewonnene Antiserum ist auf seine Charakteristiken bei der Verwendung als Zweiter Antikörper zu prüfen (Titer, Inkubationsbedingungen).

4. Inkubationsbedingungen

Die Bewerbung von Tracer und unmarkiertem Hormon um den gemeinsamen Antikörper (= sog. 1. Inkubation) erfolgt unter Gleichgewichtsbedingungen, und das Optimum der Komplexbildung ist zeit- und temperaturabhängig. Substanzen mit grossem Molekulargewicht (Proteohormone) bedürfen dazu naturgemäss längere Zeit als die niedermolekularen Steroide. In Anbetracht der individuell variierenden Affinität der Antiseren galt es deshalb, hinsichtlich Zeit und Temperatur jene Inkubationsbedingungen zu ermitteln, die sowohl den Anforderungen an die Empfindlichkeit genügen als auch die arbeitszeitlichen Grenzen berücksichtigen. In analoger Weise waren auch die Bedingungen für die Immunpräzipitation (= sog. 2. Inkubation) zu optimieren.

5. Gültigkeit des Bestimmungsverfahrens

Unter den Ausdrücken "validity" und "validation" sind all jene Kriterien und deren Erarbeitung zu verstehen, die dazu dienen, die Aussagekraft eines Radioimmunoassays festzulegen und dessen Gültigkeit zu beschreiben.

Es sind grundsätzlich 3 Gruppen von Informationen, die zur vollständigen Charakterisierung eines Radioimmunoassays notwendig sind:

- 1) Exakte Beschreibung aller im Messverfahren verwendeten Reagenzien.
- 2) Beweisführung, dass der RIA nur jene Substanz misst, zu deren Erfassung er bestimmt ist (Spezifität).
- 3) Verfahrensparameter wie Genauigkeit (accuracy), Empfindlichkeit und Präzision (precision).

Obwohl eine derartige Beschreibung der Messmethode unerlässlich ist, um die Zuverlässigkeit der Resultate zu überprüfen, enthalten vielfach Veröffentlichungen, insbesondere aus dem Bereich der angewandten Hormonanalytik, keine oder nur oberflächliche Angaben zur Richtigkeit der Methode. Dieser Mangel hat namhafte Radioimmunoassayisten dazu bewogen, detaillierte Richtlinien zu schaffen (19), nach denen die Aussagekraft eines Radioimmunoassays darzulegen ist. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, nach diesen Arbeitsgrundlagen den hier beschriebenen RIA für Schweine-LH zu charakterisieren.

3. Herstellung, Reinigung und Prüfung des markierten Antigens ("Tracer")

3.1. Wahl des Antigens

Für die vorliegende Arbeit standen uns zwei LH-Präparate zur Verfügung; es handelt sich dabei um zwei Fraktionen von unterschiedlicher Reinheit aus der Extraktion von Schweine-Hypophysen. Im Hinblick auf die Produktion eines möglichst spezifischen Antiserums wurde die reinere Fraktion für die Immunisierung benutzt (siehe 4.1.) und für die Markierung die pLH-Fraktion LER-786-3 (R 1) verwendet *).

3.2. Wahl der Methode

In Tabelle 2 sind die wesentlichsten Eigenschaften der möglichen Markierungsprinzipien zusammengestellt. Bei der Wahl der Methode für ein bestimmtes Hormon sind Anforderungen an das Endprodukt, biochemische Gegebenheiten und verfügbare Menge des Ausgangsmaterials zu berücksichtigen. Wir entschlossen uns daher für die Methode mit Chloramin-T nach Greenwood, Hunter und Glover (17), die wir in Anlehnung an Niswender et al. (46) sowie nach laboreigenen Erfahrungen modifizierten.

3.3. Prinzip und Anforderungen der Chloramin-T-Methode

Die Chloramin-T-Methode basiert auf der starken oxidativen Wirkung von Chloramin-T, welches Na^{125}I zu ^{125}I oxidiert, das seinerseits in die Tyrosinreste des Proteins eingebaut wird (siehe Abbildung 2).

* Exakte Beschreibung und Zusammensetzung der Reagenzien, Puffer und Laborhilfsmittel finden sich in den Anhängen Seiten 88-94.

Tab. 2: Markierungsmethoden

Prinzip, Bezeichnung	Beschreibung, Technik, Ausbeute	Literatur
Jod-Monochlorid-Methode	- Mikrotechnik - milde Reaktion - Die Präsenz von nicht-radioaktivem Jod begrenzt die Spezifische Aktivität; der Grad der Jodsubstitution ist höher als die erreichte Spezifische Aktivität	15 21 40 58
Elektrolytische Methode	- Einfaches Prinzip - minimale Schädigung des Proteins - niedere Spezifische Aktivität - Mit Mikrovolumina ergeben sich technische Schwierigkeiten	56 57
Chloramin-T-Methode	- geeignet für Proteine und Peptide - hohe Spezifische Aktivität - geringe bis mässige Schädigung - einfache Technik - am weitesten verbreitet	24 25 50 51 54
Enzymatische Jodierung	- milde Reaktion - minimale Schädigung - mittlere bis ausreichende Spezifische Aktivität - einfache Technik	33 38 44 51 54
Gasdiffusionsmethode	- Unter der Wirkung von Chloramin-T wird aus NaCl gasförmiges Cl gebildet, das ^{125}I aus Na^{125}I freisetzt. - Verlangt spezielle Mikrogaskammer - geringe bis mittlere Spezifische Aktivität	7
Konjugationsmethode	- Dreistufiges Markierungsprozedere, bei dem jeder Kontakt des Proteins mit oxidierenden oder reduzierenden Agentien vermieden wird, indem ein jodmarkierter Ester an das Hormon konjugiert wird; daher minimale Schädigung. - Eignet sich auch für Hormone, die kein Tyrosin aufweisen (Secretin, porcines Parathormon) - Verlangt grössere Reagenzienvolumina - mittlere Spezifische Aktivität - Empfindlichkeitseinbusse im RIA.	5 54

Die Oxidation wird durch einen Verdünnungseffekt nach Zugabe von Puffer beendet oder durch Beifügen von Natriumdisulfit unter gleichzeitiger Reduktion des nichteingebauten ^{125}I zu Jodid präzise abgestoppt. Mehrere Faktoren sind für die Qualität des Endproduktes von Bedeutung, das die ursprüngliche Immunreaktivität weitgehend behalten, aber auch eine hohe Spezifische Aktivität aufweisen soll:

Einmal sind die eingesetzten Proteinmengen sowie die Volumina der Begleitreagenzien (im untersten Mikrogramm- bzw. Mikroliterbereich) gering zu halten, weil der prozentuale Einbau der vorhandenen Jodatome stark von der Proteinkonzentration im Reaktionsgemisch abhängt (25). Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurde eine LH-Lösung von 1 μg bzw. 0.03 nanomol / μl (R 1) hergestellt und zur Herabsetzung von Verfahrensverlusten als Einzeldosen zu 5 μl in 2 ml-Stechampullen, die später als Reaktionsgefäße dienten, bei -20°C gelagert. Als Lösungsmittel diente Aqua bidest, wodurch schädigende Wirkungen von Salzen beim Einfrieren und Auftauen vermieden werden können.

Ein zweites Erfordernis besteht im Einhalten des eng begrenzten pH-Optimums, das bei $\text{pH} = 7.5$ liegt (25); diese Bedingung wurde durch Zugabe eines Natriumphosphatpuffers (P 1) unmittelbar vor der Markierung erfüllt.

Im Weiteren sind die Lösungen von Chloramin-T (R 2) und Natriumdisulfit (R 3) frisch zuzubereiten, um die Konstanz der Spezifischen Aktivität sicherzustellen.

Wohl das wesentlichste Kriterium für den Markierungserfolg ist die Reaktionszeit. Zusammen mit der Chloraminmenge vermag sie die Spezifische Aktivität am stärksten zu steuern; eine massiv verlängerte Reaktionszeit führt zudem zu dijodsubstituierten Tyrosinresten, was hinsichtlich der Immunreaktivität des Endproduktes unerwünscht ist (25,50).

Für den Probenauftrag bei der anschliessenden Säulenchromatographie wurde dem Reaktionsgemisch eine Transferlösung (R 4) beigelegt; ihr Gehalt an Sucrose ermöglichte das Unterschichten, während ihr KI-Anteil zur Anreicherung kleinmolekularer Verbindungen diente, und ihre Bromphenolblau-Komponente gestattete die Kontrolle des Säulendurchflusses. Das mit Transferlösung versetzte Gesamtgemisch wurde laborintern als "Original" bezeichnet.

3.4. Markierungsprozedere

Für einen reproduzierbaren Markierungserfolg erwies sich das disziplinierte Einhalten der einmal als optimal befundenen Arbeitstechnik als unabdingbar notwendig. Die nachfolgende exakte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte hielt man deshalb für angezeigt.

Vorbereitung

- 1) Beladen des Fraktionensammlers (L 1) mit 200 Polystyrolröhrchen zu 5 ml (L 2).
- 2) Zugabe von 2.0 ml PBS-Gel (P 4) als sog. Vorlage in jedes Röhrchen mit der Repetierspritze (L 3).
- 3) Zubereiten der Lösungen von Chloramin-T (R 2) und Natriumdisulfit (R 3).
- 4) Die Ampulle mit der LH-Lösung (R 1), Transferlösung (R 4) und die vorbereiteten Reagenzien stellte man in die Glove Box (L 4), in welcher über einen Ventilator ein Unterdruck von 5 mm Hg erzeugt wurde.
- 5) Für jedes Reagens (Ausnahme: LH-Lösung und Na^{125}I) wurde je eine Hamilton-Spritze (L 5) 10 Mal mit Puffer (P 1) und 5 Mal mit dem entsprechenden Reagens gespült, bevor sie blasenfrei mit dem Reagens gefüllt und auf das verlangte Volumen justiert wurde.

Markierung

- 1) Entfernen der Gummikappe auf dem Reaktionsgefäß (LH-Ampulle mit 5 µg pLH in 5 µl Aqua bidest).
- 2) Zugabe von 50 µl Natriumphosphatpuffer (P 1).
- 3) Zugabe von 1 mCi Na¹²⁵I (in der Regel 10 µl, R 5).
- 4) Verschluss des Reaktionsgefäßes.
- 5) Zugabe von 10 µl (= 20 µg) Chloramin-T (R 2) unter Durchstechen des Gummistopfens.
- 6) Einhalten der Reaktionszeit von 60 Sekunden mit Stoppuhr. Mischen des Ampulleninhaltes durch Klopfen mit dem Finger.
- 7) Zugabe von 50 µl (= 100 µg) Natriumdisulfit (R 3) unter Durchstechen des Gummistopfens.
- 8) Zugabe von 400 µl Transferlösung (R 4) unter nochmaligem Durchstechen des Gummistopfens. Die Spritze wurde im Reaktionsgefäß belassen.

Die einzelnen Reagenzien wurden nahe an der Flüssigkeitsoberfläche abgegeben. Die Kanülenspitzen kamen nicht mit dem Reaktionsgemisch in Berührung; hängende Tropfen wurden an der Wand abgestreift.

3.5. Reinigung des "Originals"

Nach der Markierung ist aus dem "Original", das erwartungsgemäß (25) mehrere Komponenten enthält (Aggregate, intaktes Hormon, Spaltprodukte, Na¹²⁵I und verbleibende Reagenzien), das immunreaktive LH zu isolieren. Wir entschieden uns - zu Vergleichszwecken - für die Gelfiltration über Sephadex G-75 sowie für die von JEFFCOATE (29) empfohlene Zellulose-Adsorptionschromatographie (intaktes, immunreaktives LH soll von Zellulose adsorbiert werden).

3.5.1. Gelfiltration über Sephadex G-75

Die Säule (L 6; 1.5 x 27.0 cm) wurde mit dem gequollenen Gel unter hydrostatischem Druck gepackt und während mindestens 24 Stunden vor Gebrauch mit der späteren Flussgeschwindigkeit (100 µl/min) mittels einer Peristaltikpumpe (L 7) mit PBS (P 3) äquilib-

briert. Um Hormonverluste durch Adsorption an die Säulenwand zu vermeiden, wurde die Säule vor dem Trennprozess mit 20 mg HSA (R 7) beschickt.

Unmittelbar nach der Markierung wurde das mit Transferlösung (R 4) versetzte Original auf die Säule durch Unterschichten aufgetragen. Während als Elutionspuffer PBS (P 3) diente, fing man die Einzeleluat zu 10 Tropfen mittels des Fraktionensammlers (L 1) in Polystyrolröhrchen zu 5 ml (L 2) auf, die als Vorlage 2.0 ml PBS-Gel (P 4) enthielten. Als günstig hinsichtlich Trennqualität und Zeitaufwand erwies sich eine Durchflussgeschwindigkeit von 100 μ l/min.

Von je 100 μ l der Einzeleluat bestimmten wir im Gammazähler (L 8) die Radioaktivität und zeichneten daraus das Radiochromatogramm (Abb. 3).

3.5.2. Zellulose-Adsorptionschromatographie

Als Säule benutzte man eine Einmalspritze zu 20 ml, die bis zur Hälfte mit Zellulosepulver (R 10) gefüllt und danach 5 Mal mit je 10 ml PBS (P 3) gespült wurde. Nach dem Auftragen des Originals wurde das System 10 Mal mit je 5 ml PBS (P 3) beschickt, um damit nicht-immunreaktive Kontaminanten aus der Säule herauszuwaschen; die Puffereluat wurden ebenfalls in Polystyrolröhrchen (L 2) aufgefangen.

Das an Zellulose adsorbierte Hormon wurde mit 5 ml normalen Pferdeserums (50% in PBS) eluiert, bevor man die Säule abschliessend 10 Mal mit je 5 ml PBS nachwusch.

Analog zu 3.5.1. wurde anhand der Radioaktivität der Einzeleluat ein Radiochromatogramm erstellt.

3.6. Immunreaktivität der Einzeleluat

Um vergleichbare Bedingungen für die Beurteilung der Immunreaktivität zu schaffen, stellten wir für die anschliessende Inkubation die Aktivitätskonzentration der Einzeleluat mit PBS-Gel (P 4) auf 30'000 cpm pro 100 μ l ein. Das verwendete Inkubationsprogramm ist aus Tab. 3 ersichtlich.

Tab. 3: Inkubationsprogramm zur Prüfung der Immunreaktivität

Röhrchen Nr.	Bezeichnung	PBS-Gel [µl]	Anti-LH [µl]	Eluat [µl]	ARGG ²⁾ [µl]
1 + 2	Total Eluat x	-	-	100	-
3 + 4	Bo ¹⁾ Eluat x	500	200	100	200

1) Bo = Inkubat ohne Standard; 2) ARGG = Anti-Rabbit-Gamma-Globulin (siehe 5.).

1. Inkubation: 48 Std. bei 4°C

2. Inkubation: 8-12 Std. bei 4°C

Am Ende der Inkubation wurden die mit Anti-LH versetzten Inkubate mit je 2.0 ml PBS-Gel (P 4) vorgewaschen (41) und während 30 min bei 4°C und 1100 g zentrifugiert. Nach Dekantieren und Absaugen des Ueberstandes wurde die Radioaktivität der Präzipitate bestimmt und in % der jeweiligen Gesamtaktivität (Total) ausgedrückt. Eluate, die sich zu über 45% der eingesetzten Gesamtaktivität an den Antikörper zu binden vermochten, wurden gepoolt; in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Beispiel bestand der Pool aus den Eluaten 23-31. Mittels PBS-Gel stellten wir daraus den Arbeitstracer mit einer Anfangskonzentration von 30'000 cpm pro 100 µl her.

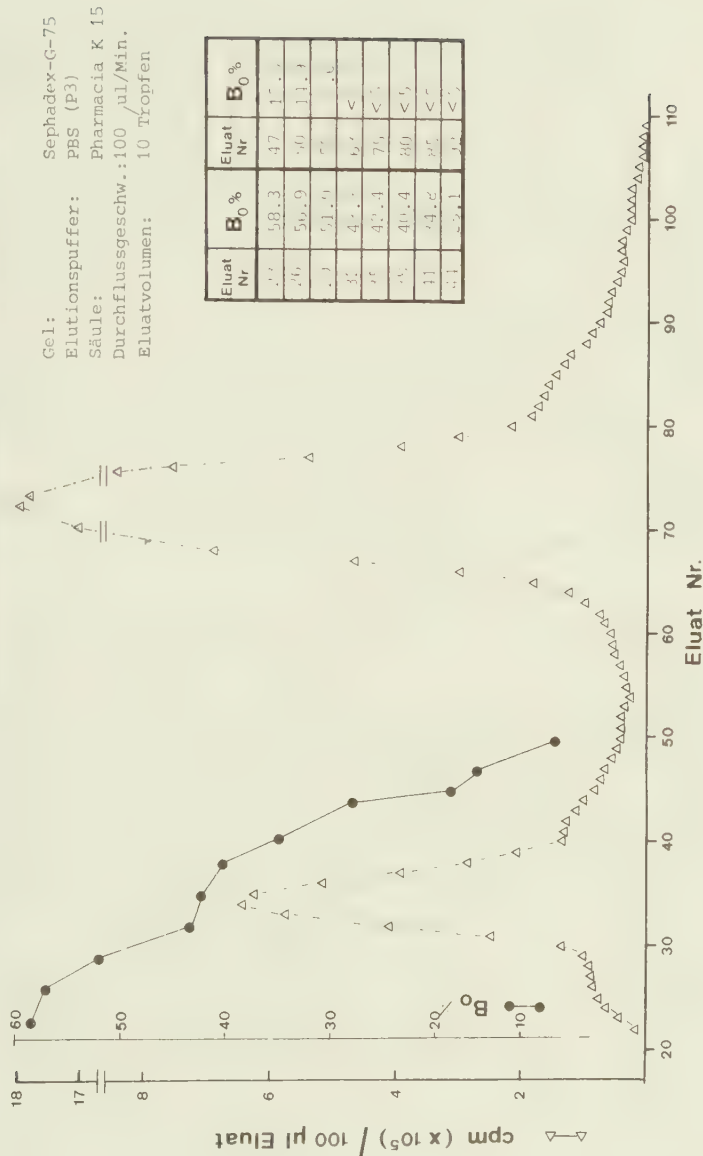
Die Ergebnisse dieser Inkubation (Tab. 4) zeigten klar, dass die Eluate aus der Fraktionierung über Sephadex G-75 jenen aus der Zellulose-Adsorptionschromatographie hinsichtlich Immunreaktivität weit überlegen waren. Demzufolge kam im weiteren Verlauf der Arbeit ausschliesslich die Gelfiltration zur Anwendung.

Tab. 4: Immunreaktivität der Eluate aus verschiedenen Trennverfahren

Trennverfahren	Total [cpm]	Bo ¹⁾ [%]
Gelfiltration	27'551	52.9
Zellulose-Adsorption	26'467	29.1

¹⁾ Als Antiserum diente in beiden Serien Anti-pLH 1707/4 1:5'000.

Abb. 3 : Radiochromatogramm nach säulenchromatographischer Trennung des "Originals" und Immunreaktivität einzelner Eluate (Erläuterungen s.S.23)



3.7. Spezifische Aktivität

Die Qualität der Markierung wird, abgesehen von der Immunreaktivität, mit der erlangten Spezifischen Aktivität charakterisiert. Sie gibt an, wieviel der eingesetzten Radioaktivität in das Protein eingebaut worden ist [$\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$].

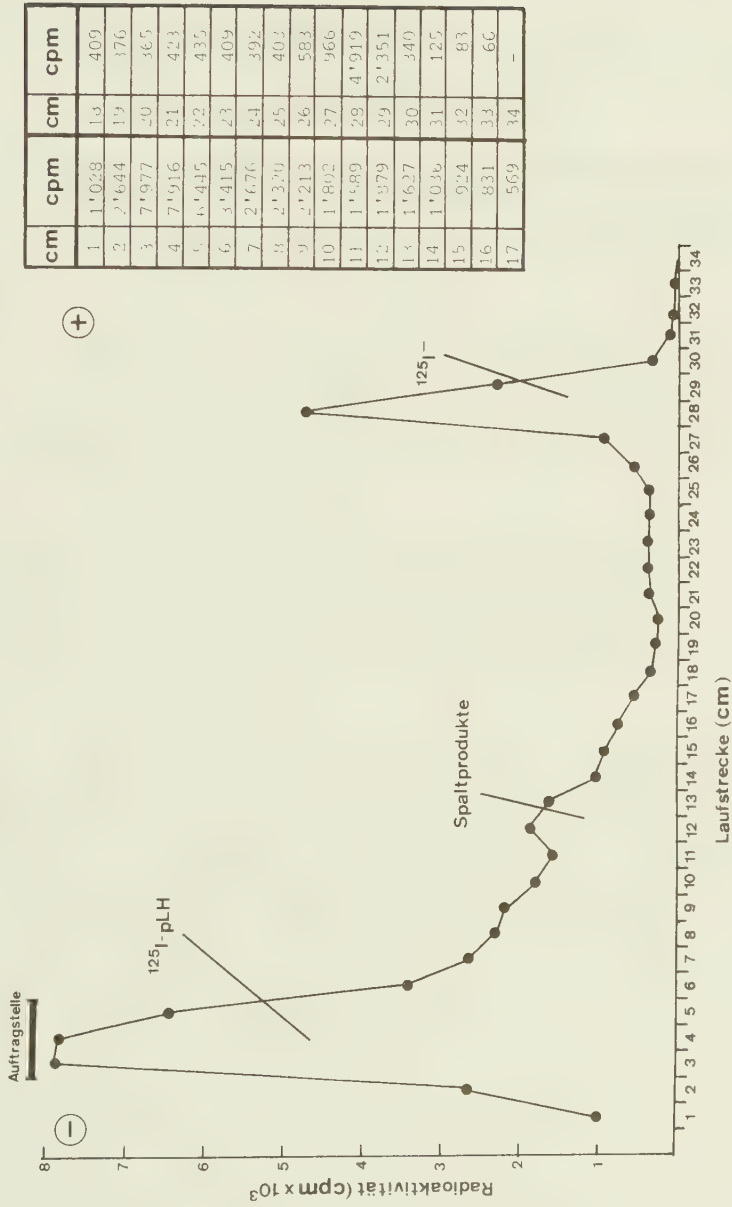
Als technisches Hilfsmittel bedienten wir uns der Papierelektrophorese; der verwendete Träger (Toyo-Papier, L 10) besitzt die Eigenschaft, intaktes LH an der Auftragstelle zu adsorbieren, während die übrigen Bestandteile des Originals ihrer Molekulargrösse und Ladung entsprechend im elektrischen Feld wandern. Praktisch begann man damit, dass 3 cm breite Streifen auf eine Länge von 50 cm zugeschnitten und mit Bleistift in der Laufrichtung in 1 cm breite Felder eingeteilt wurden, welche vom Kathodenende her fortlaufend numeriert wurden. Die Streifen spannte man nach gründlichem Benetzen im Elektrophorese-Puffer (P 5) über einen Kunststoffträger, der mit je einer Wange in den Pufferwannen stand.

200 μl des verdünnten Originals [30'000 cpm/100 μl HSA (R 7)] wurden kathodenwärts auf ein 3 x 3 cm messendes Startfeld aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 400 V und 5 mA/Streifen gestartet. Nach einer Laufzeit von 2 Stunden liess man die Streifen trocknen und schnitt sie anschliessend in die vorgezeichneten Einzelstücke. Anhand der Radioaktivität der numerierten Fraktionen konnte das Radiochromatogramm aufgezeichnet werden (Abb.4).

Die Spezifische Aktivität wurde wie folgt berechnet (konkrete Zahlen aus dem in Abb. 4 dargestellten Beispiel):

Gesamtaktivität (Summe aller Einzelaktivitäten)	59'377 cpm = 100% = 1000 μCi
Intaktes LH (Eluate 1-8)	34'421 cpm = 58.0% = 580 μCi
Spaltprodukte (Eluate 9-22)	14'479 cpm = 24.4% = 244 μCi
Na^{125}I (Eluate 22-40)	10'437 cpm = 17.6% = 176 μCi

Abb. 4 : Radiochromatogramm des "Originals" nach papierelektrophoretischer Auftrennung



$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Proteingebundene Aktivität}}{\text{Proteinmenge}} = \frac{824 \mu\text{Ci}}{5 \mu\text{g}} =$$

$$\underline{164.8 \mu\text{Ci}/\mu\text{g pLH}}$$

Nach der Standardisierung der Markierungsmethode in Vorversuchen wurden insgesamt 9 Markierungen von porcinem LH durchgeführt. Die dabei erreichte Spezifische Aktivität betrug im Mittel $167.15 \pm 11.57 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3.8. Diskussion der erarbeiteten Methoden

Wie bei Glycoprotein-Hormonen allgemein üblich benützten wir die verlässliche Methode mit Chloramin-T. Obwohl diese Technik mehrfach beschrieben wurde (24,25,50 u.a.m.), waren Adaptationen an die eigenen Verhältnisse und Ausrüstung notwendig. Das unter 3.4. dargelegte Vorgehen hat sich in unseren Versuchen bewährt, indem durchwegs eine hohe Spezifische Aktivität erlangt werden konnte. Als nicht zu unterschätzende Voraussetzung stellte sich eine exakte Vorbereitung und Anordnung der Reagenzien heraus, damit eine verzugslose Arbeitsfolge bei der Markierung gewährleistet war.

Die Isolierung des immunreaktiven Hormons aus dem Original mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 führte zu Eluaten, die frei von Spaltprodukten und Natriumjodid waren; das Trennsystem war allerdings nicht in der Lage, Hormonaggregate vom intakten Molekül zu separieren, was wir als Ursache für die mässig reduzierte Immunreaktivität ansehen. Versuche, mit der Wahl eines Gels von höherer Porengrösse eine weitere Fraktionierung des Proteinpeaks zu erreichen, führten nicht zum erwarteten Erfolg. Obwohl damit die Breite des Peaks geweitet wurde, gelang keine klar abgegrenzte Isolierung der Polymerisate; immerhin konnten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen Eluaten im aufsteigenden und absteigenden Schenkel festgestellt werden, doch waren sie zu gering, als dass sie die Belastung der als Routineverfahren ausgearbeiteten Technik mit subtiler Eluatauswahl

gerechtfertigt hätten. Zudem verfügt man bei Verwendung des Gesamtpeaks über hinreichend Tracermaterial, um damit Inkubationsansätze unter weitgehend vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich des markierten Antigens über längere Zeit durchzuführen.

Bei der vergleichsweisen Betrachtung des Radiochromatogramms und der Bindungskapazitäten einzelner Eluate (Abb. 3) muss im Auge behalten werden, dass die pro Eluat gemessene Radioaktivität nicht zwingend der Menge an Protein im Eluat entspricht. Die Tyrosinreste sind nicht homogen über das LH-Molekül verteilt, so dass Spaltprodukte gegebenenfalls eine höhere Radioaktivität aufweisen können, als intaktes, immunreaktives Hormon. Diese Annahme wird denn auch von Abb. 4 unterstützt, der ein anderes Trennungsvorgehen als jenes in der Gelfiltration (Abb. 3) zugrunde liegt.

Im Gegensatz zur Gelfiltration mussten wir nach Adsorptionschromatographie an Zellulose eine deutlich reduzierte Immunreaktivität feststellen. Die günstigen Resultate, die von JEFFCOATE (29) mitgeteilt wurden, waren mit menschlichem LH zustande gekommen. Es wäre durchaus denkbar, dass porcines LH weniger stark an Zellulose adsorbiert wird als das humane. Um diese Frage abzuklären, müsste untersucht werden, ob sich bei Eluierung in kleinen Fraktionen ein sog. Tailing feststellen liesse, was als eine geringere Adsorptionsfähigkeit anzusehen wäre. Wahrscheinlicher scheint uns jedoch die Möglichkeit, dass mit dem Pferdeserum Komponenten in das Inkubationssystem eingebracht werden, welche die Immunreaktion zwischen markiertem Antigen und dem Antikörper beeinträchtigen.

4. Antiserum gegen pLH - Erster Antikörper - Anti - pLH

4.1. Immunogen

Als Immunogen diente die hochgereinigte pLH Fraktion LER 778-4 (R 17) mit einer LH-Aktivität von 0.5 NIH-LH-S 1 U/mg.

4.2. Serumtiere

Für die Stimulation von Antiseren gegen porcines LH wurden 5 kastrierte männliche Kaninchen (mittelgrosse Albino-Kaninchen, New Zealand) verwendet, die zu Versuchsbeginn 3-5 Monate alt waren. Sie wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten jeden 2. Tag 150 g Kaninchenalleinfutter*, das mit täglichen Heugaben ergänzt wurde, sowie Wasser ad libitum.

4.3. Immunisierungsverfahren

Die unter 2.2. aufgestellte Forderung, mit einem minimalen Aufwand an Material und Zeit die Antikörperbildung zu stimulieren, bewog uns, die von VAITUKAITIS et al. (60) empfohlene Immunisierungsmethode zu übernehmen. Ihr Vorteil liegt darin, dass bei intrakutaner Verabreichung an zahlreichen Loci bloss kleinste Immunogenmengen (20-100 µg Glykoproteine oder Steroidkonjugate pro Tier) eingesetzt werden müssen, um Antiseren mit ausreichendem Titer zu erzeugen.

Das lyophilisierte Antigen wurde mit 0.95 %-iger NaCl-Lösung in

* Nr. 814 der Firma NAFAG, Gossau, Schweiz

einer Glasspritze gelöst, bevor Freundsches Adjuvans (komplett bei der Grundimmunisierung, inkomplett bei den Boosterinjektionen, R 11) und Arlacel A (R 12) beigelegt wurden. Die Komponenten wurden auf einem Virtis-Homogenisator (L 11) zu einer pastenartigen Emulsion vermengt, die man blasenfrei in eine zweite Injektions-spritze aus Glas transferierte (Zusammensetzung siehe Tabelle 5).

Vor der Grundimmunisierung wurden die Kaninchen mit 40 mg Pento-barbital (R 13) i.v. pro kg Körpergewicht narkotisiert und an Rücken und Seitenbrust grossflächig und hautnah geschoren. Die Emulsion wurde an ca. 2 x 50 Stellen intradermal verabreicht.

Die erste Wiederholungsimpfung erfolgte 70 Tage nach der Grundimmunisierung, jede spätere Boosterinjektion frühestens 2 Monate nach der vorangegangenen.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Verabreichungsmodus des Immunogens

Ziel	pLH [µg]	NaCl [ml]	Adjuvans [ml]*	Arlacel A [ml]	Injektions- modus
Grundimmunisierung	100	0.4	CFA 0.4	0.2	intradermal 2 x 50 Loci
Boosterinjektion	100	0.4	IFA 0.4	0.2	subcutan 2 x 2 Loci

* CFA = Freundsches Adjuvans komplett

IFA = Freundsches Adjuvans inkomplett

4.4. Blutentnahme und Serumgewinnung

- Zeitplan und Entnahmevermögen:

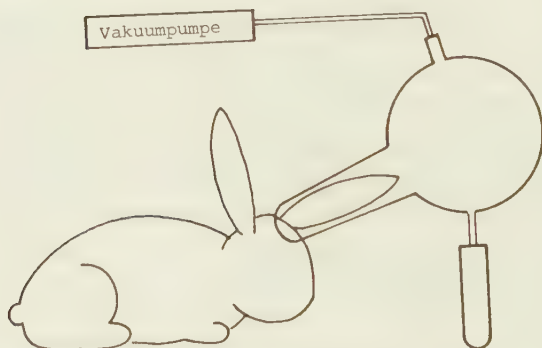
- . Nach der Grundimmunisierung mehrmals im Abstand von 10 Tagen; je 10 ml Blut.
- . Nach Boosterinjektionen bloss 1 Mal zwischen dem 10. und 12. Tag post inj.; je 50 ml Blut.

- Entnahmetechnik: Die Kaninchen liess man 24 Stunden vor der Entnahme fasten. Für die Blutgewinnung wurden die Tiere in einen

Zwangskäfig verbracht, welcher den Kopf für die Manipulationen am Ohr freiließ. Zur Hyperämisierung wurde das eine Ohr mit Toluol betupft. Mit Hilfe einer Skalpellklinge wurde eine Ohrvene möglichst apikal angeschnitten, so dass das Blut tropfenweise austreten konnte. Nachdem man den eigens zu diesem Zweck angefertigten vaselinisierten Glaskolben (Abb. 5) über das Ohr gestülpt hatte, wurde über eine elektrische Vakuum- oder über eine Wasserstrahlpumpe die erforderliche Blutmenge abgesogen.

- Serumgewinnung: Das Blut liess man während 6 Stunden in den ebenfalls vaselinisierten Auffanggefässen bei 4°C zur Fibrinbildung stehen. Das nach dem Zentrifugieren überstehende Antiserum wurde abgehebert und bei -20°C gelagert. Nach Feststehen der Antiserumcharakteristika wurden die Antiseren als Stammlösungen 1:400 in EDTA-PBS (P 6) in geeigneten Portionen lyophilisiert.

Abb. 5: Schema der Blutentnahme beim Kaninchen



4.5. Bestimmung des Antikörpertiters

Mit "Titer" wird jene Verdünnung des Antiserums im Inkubat bezeichnet, welche erforderlich ist, um 40 - 60 % des markierten Antigens in Abwesenheit des unmarkierten Antigens zu binden (26). Zur Titerbestimmung werden - wie in Tabelle 6 dargestellt - konstante Mengen des markierten Antigens (Tracer) mit steigenden Verdünnungen des Antiserums inkubiert und anschliessend mit ARGG gefällt.

Tab. 6: Inkubationsprogramm zur Titerbestimmung

Probe Nr.	Bezeichnung	Puffer [µl]	Antiserum [µl]	Tracer [µl]	ARGG [µl]
1,2	Total	-	-	100	-
3,4	Anti-pLH 1: 400 in EDTA-PBS (P 6)	500	200	100	200
5,6	Anti-pLH 1: 1'000 in NRS 1:400 (P 7)	500	200	100	200
7,8	Anti-pLH 1: 4'000 in NRS 1:400	500	200	100	200
9,10	Anti-pLH 1:10'000 in NRS 1:400	500	200	100	200
11,12	Anti-pLH 1:40'000 in NRS 1:400	500	200	100	200
13,14	AntipLH 1:100'000 in NRS 1:400	500	200	100	200

1. Inkubation: 48 Std bei 4°C

2. Inkubation: 12 Std bei 4°C

Nach Abschluss der 2. Inkubation wurden die Inkubate mit 2.0 ml PBS-Gel (P 4) vorgewaschen (41) und während 30 min bei 4°C und 1100 g zentrifugiert. Von den Präzipitaten bestimmte man die Radioaktivität; sie stellt jenen Anteil des Tracers dar, welcher von der jeweiligen Antiserumverdünnung gebunden werden kann, und wird in % der Gesamtaktivität (Total) ausgedrückt. Diese Masszahl wird

allgemein als %B bezeichnet.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse aus der Titerbestimmung wurde für jedes Antiserum die sog. Titrationskurve (Abb. 6) aufgezeichnet. Sie ermöglicht die visuelle Beurteilung der Bindungsfähigkeiten eines Antiserums bei verschiedenen Verdünnungen und dient zur Festlegung jener Arbeitsverdünnung, welche 40-60% des markierten Antigens in Abwesenheit von unmarkiertem LH zu binden in der Lage ist (26). Aus den in Abb. 6 vorgelegten Titrationskurven wurden demzufolge für das Antiserum 1707/4 eine Arbeitsverdünnung von 1:4'000, für 1707/6 eine solche von 1:10'000 für das weitere Vorgehen ausgewählt.

Die Titerbestimmung muss zu einem routinemässigen Verfahren ausgearbeitet werden, weil sie nach jeder Blutgewinnung, auch am gleichen Tier, für jedes Antiserum neu durchzuführen ist. Es erwies sich deshalb als zweckmässig, ein uniformes Vorgehen aufzustellen, damit Titrationsergebnisse von verschiedenen Antiseren, insbesondere auch Antiseren vom gleichen Tier, untereinander verglichen werden dürfen. Diesbezügliche Vergleichsstudien bestätigen bisherige Erfahrungen am Institut für Zuchthygiene, dass nach einer Boosterinjektion der Antikörpertiter am höchsten ist, wenn das Antiserum zwischen dem 10. und 12. Tag post inj. gewonnen wurde.

Ein Titeranstieg war auch mit zunehmender Anzahl Boosterinjektionen festzustellen (Abb. 6 und 7).

In Bezug auf die Uniformität der Arbeitsmethode wurde von jedem Antiserum eine Stammlösung von 1:400 in EDTA-PBS (P 6) hergestellt, so dass alle weiteren Verdünnungen auf diesem Ausgangsmaterial basieren. Als Verdünner für die Arbeitslösungen benützten wir NRS 1:400 in EDTA-PBS (P 7), womit im Hinblick auf die Präzipitationsbedingungen während der 2. Inkubation (siehe 5.5.) in jeder beliebigen Arbeitsverdünnung das Vorhandensein einer konstanten Menge an Kaninchengammaglobulin sichergestellt wurde.

Abb. 6 : Titrationskurven für verschiedene Anti-pLH Seren von Kaninchen Nr. 1707.

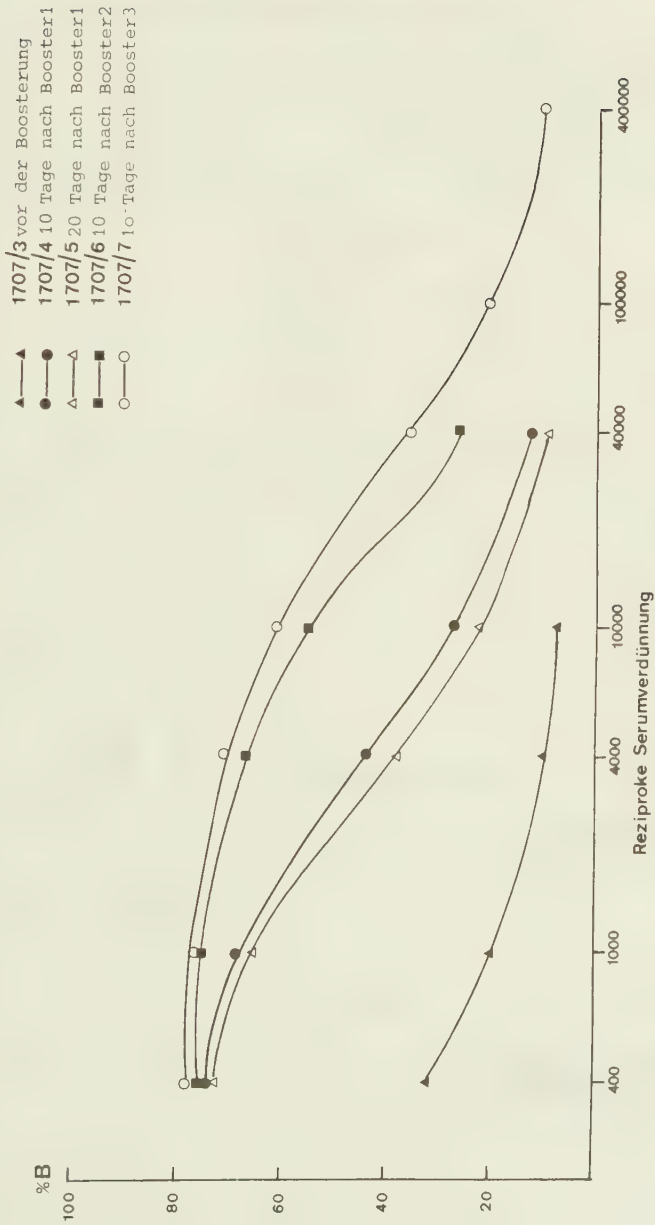
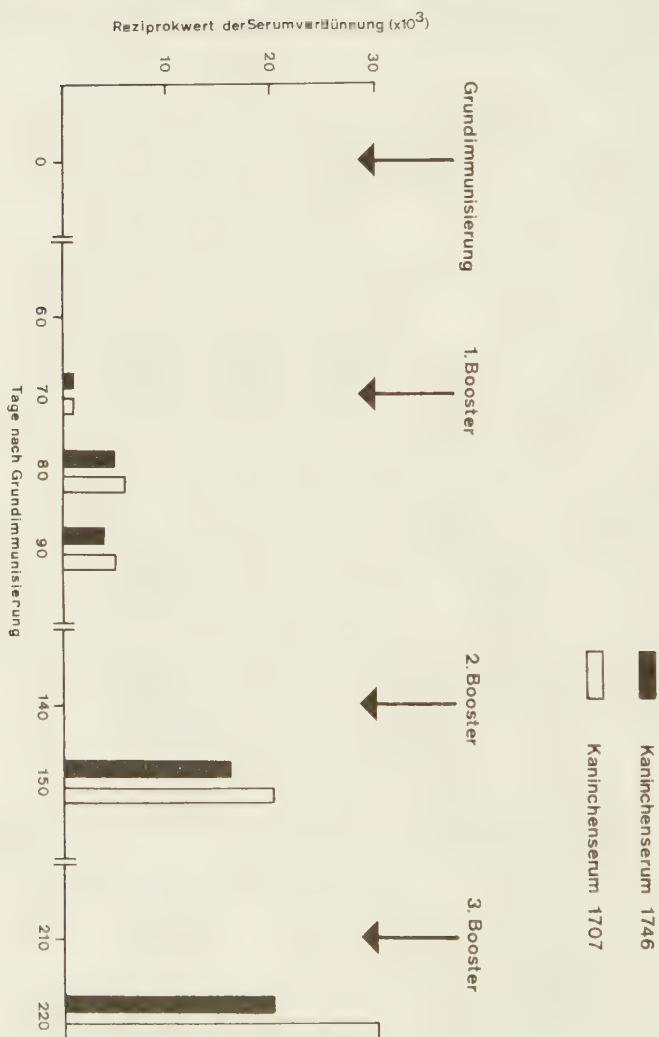


Abb. 7 : Arbeitsverdünnung verschiedener Anti-PLH Seren



4.6. Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur

Dauer und Temperatur der 1. Inkubation spielen naturgemäss eine bedeutende Rolle bei der Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe. Um die Einflüsse dieser beiden Faktoren auf die Immunreaktion zu untersuchen, prüften wir die prozentuale Bindung bei zwei verschiedenen Inkubationstemperaturen und bei mehreren Inkubationszeiten. Die Versuchsanordnung geht aus Tabelle 7 hervor.

Tabelle 7: Inkubationsprogramm zur Prüfung des Einflusses von Temperatur und Dauer der 1. Inkubation auf die prozentuale Bindung

Probe Nr.	Bezeichnung	PBS-Gel [µl]	Anti-pLH [µl]	Tracer [µl]	ARGG [µl]
1,2	Total	-	-	100	-
3,4	Bo 2 Std	500	200	100	200
5,6	Bo 4 Std	500	200	100	200
7,8	Bo 6 Std . . . usw.	500	200	100	200

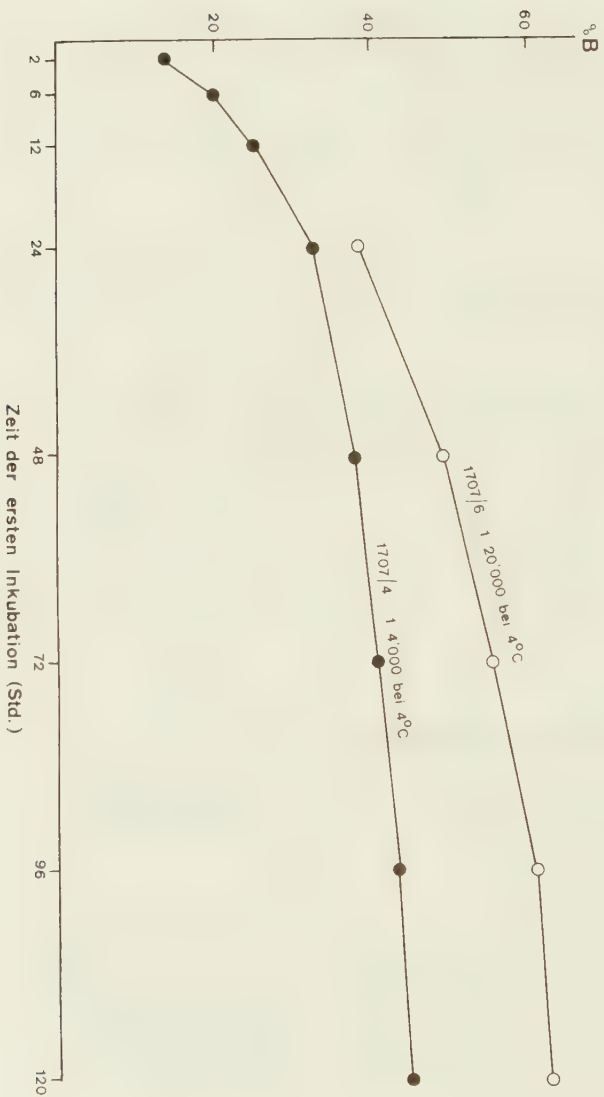
1. Inkubation: In Zeitintervallen zwischen 2 und 120 Std bei 4°C und bei 37°C.

2. Inkubation: 24 Std bei 4°C.

Die Inkubationen bei 37°C blieben hinsichtlich der erreichbaren prozentualen Bindung weit hinter jenen bei 4°C zurück. Dieselbe Erfahrung machten wir auch bei der Prüfung der Inkubationsbedingungen für die Präzipitationsreaktion. Demzufolge wurden alle weiteren Inkubationen im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die prozentuale Bindung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Im Anschluss an eine steile Anstiegsphase scheint sich nach 48 Std eine Plateaubildung einzustellen; obwohl

Abb. 8 : B_0 in Abhängigkeit der Zeit (Zweite Inkubation 24 Std. bei 4°C)



darin noch weitere Zunahmen des antikörpergebundenen Aktivitätsanteils feststellbar waren, bedeuten diese keinen wesentlichen Gewinn mehr, der sich zur Verbesserung der Zählstatistik rechtfertigen liesse. Zusammen mit arbeitszeitlichen Ueberlegungen wurde deshalb die Dauer der 1. Inkubation für die Routinebestimmung auf 48-72 Stunden festgelegt; Abweichungen innerhalb dieser Limiten wurden toleriert.

4.7. Spezifität des Antikörpers gegen porcines LH

Unter der Spezifität eines Antiserums versteht man seine Freiheit bzw. den Grad seiner Freiheit von Interferenz durch andere Substanzen als durch das zu bestimmende Hormon. Da Antiseren in dem Sinne heterogen sind, als sie eine Population verschiedener Antikörper enthalten, ist die Spezifität eines Antiserums die Resultante aller in ihm enthaltenen Antikörper.

Die Spezifität eines Antiserums wird von der Molekülstruktur des Immunogens mitbestimmt. Allerdings kann die Natur der Antikörper-Bindungsorte von einem Antikörper zum andern variieren, selbst wenn für die Immunisierung das gleiche Immunogen verwendet worden ist. Die Spezifität kann gegen das eine und / oder andere Segment des Immunogenmoleküls gerichtet sein; diese Tatsache ist vor allem dann von Bedeutung, wenn in der Testprobe Strukturen vorkommen, die jener sehr ähnlich sind, welche vom Antikörper als antigene Determinante erkannt wird.

Eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Spezifität eines Antiserums besteht darin, dass man die Fähigkeit verwandter Hormone (oder Verbindungen) prüft, die Bindung des radioaktiven Hormons an den Antikörper zu hemmen. Exakt definierte Mengen des zu untersuchenden Hormons werden mit konstanten Mengen seiner radioaktiven Form und des Antiserums inkubiert; so ergibt sich die sog. Standardkurve, aus der für jede Standarddosis die erreichte prozentuale Bindung ersichtlich wird. Für das weitere Vorgehen interessiert insbesondere jene Hormonmenge, welche 50 % des Tracers aus der

Antikörperbindung zu verdrängen vermag.

Die zu prüfenden verwandten Hormone, von denen man eine Kreuzreaktion mit dem fraglichen Antiserum beweisen oder ausschließen will, werden ebenfalls in exakt definierten Mengen mit konstanten Mengen an Tracer und Antikörper inkubiert; für jedes dieser Hormone bestimmt man - wie zuvor erwähnt - jene kritische Menge, welche 50 % des Tracers aus der Antikörperbindung verdrängen kann.

Als Mass für die Spezifität dient die "Relative Aktivität". Sie berechnet sich als Quotient aus der Menge des homologen Hormons, welche 50 % des gebundenen Tracers verdrängt, und der Menge des kreuzreagierenden Hormons, welche ihrerseits 50 % des gebundenen Tracers verdrängt:

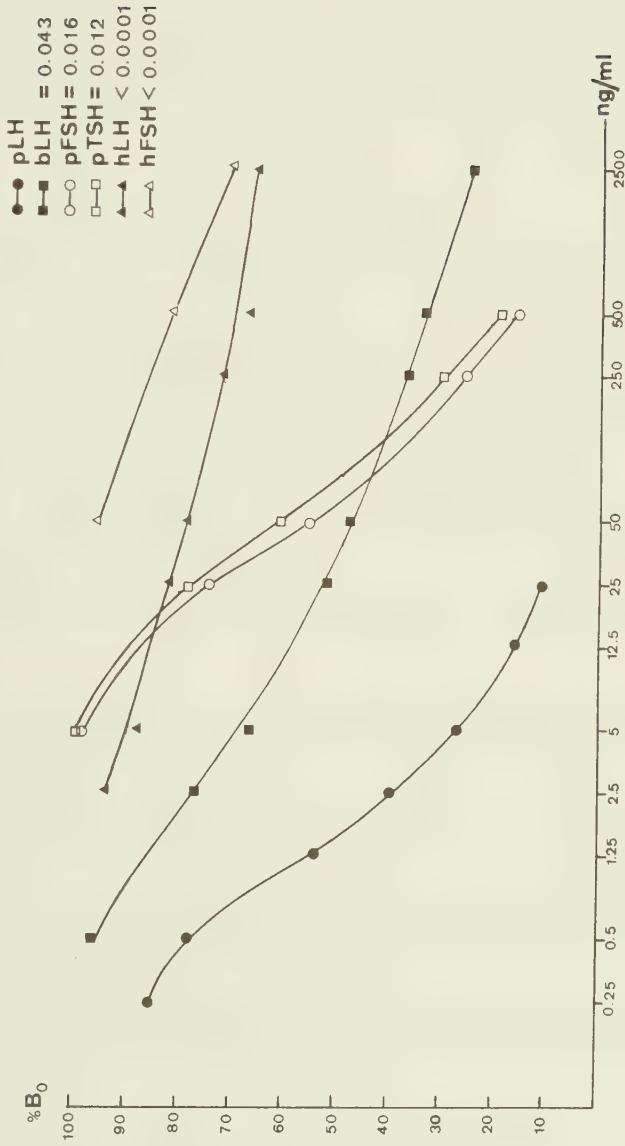
$$\text{Relative Aktivität} = \frac{\text{Menge des homologen Hormons, welche 50 \% des gebundenen Tracers verdrängt}}{\text{Menge des kreuzreagierenden Hormons, die 50 \% des gebundenen Tracers verdrängt}}$$

Manche Autoren multiplizieren den erhaltenen Quotienten mit dem Faktor 100 und bezeichnen das Resultat als Prozente. Uns erscheint diese Ausdrucksweise zumindest als verwirrend: eine Substanz hat eine Kreuzreaktion oder sie hat keine; Prozentzahlen verführen zur Annahme, dass vom ermittelten Gehalt eines Hormons beispielsweise 12 % durch Interferenz einer kreuzreagierenden Substanz fälschlicherweise mitgemessen worden wären. Wir folgen deshalb NISWENDER and MIDGLEY (47), welche die Relative Aktivität als Quotienten ausdrücken, und verzichten bewusst auf die Multiplikation mit 100.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Relativen Aktivitäten unserer Antiseren mit den folgenden Hormonen überprüft:

porcines FSH	pFSH-ucb-1031	(ucb, Brüssel, Belgien)
porcines TSH	pTSH-ucb-1025	(ucb, Brüssel, Belgien)
bovines LH	LER-1072-2	(Bezug wie R 1)
humanes FSH	hFSH	(Bezug AB Kabi, Stockholm,
humanes LH	hLH	Schweden)

Abb. : Relative Aktivität verschiedener Glykoproteinhormone (Anti-pLH 1707/6)



4.8. Diskussion

Immunisierung und Titer: Die Stimulation eines Antiserums, das allen Anforderungen genügen kann, ist hinsichtlich Zeit, Tiermaterial und Arbeit der aufwendigste Teil beim Erstellen eines Radioimmunoassays. Aus der von VAITUKAITIS et al. (60) vorgeschlagenen Immunisierungsmethode übernahmen wir die intradermale Applikationsart und die geringe Dosierung des Immunogens, die dem limitierten Vorrat Rechnung trug.

Im Gegensatz zu den Befunden dieser Autoren erreichten wir bei keinem der 5 Kaninchen nach der Grundimmunisierung einen ausreichenden Antikörpertiter, so dass wir Boosterinjektionen vornehmen mussten.

Unsere Ergebnisse (Abb. 6 und 8) standen in Uebereinstimmung mit den von HURN and LANDON (26) empfohlenen Richtlinien und den am Institut für Zuchthygiene mit Proteo- und Steroidhormonen mehrfach gemachten Erfahrungen, dass es ratsam ist, zwischen den einzelnen Boosterinjektionen mindestens 1 Monat zuzuwarten. Eine frühere Stimulation kommt einer Verschwendung von Zeit, Material und Arbeit gleich. Ebenso bedeutsam ist der Zeitpunkt der Blutgewinnung nach den Injektionen: Eine Blutentnahme ausserhalb des Zeitraums zwischen dem 9. und 12. Tag post inj. ist mit einer Einbusse im Titer verbunden.

Blutentnahme: Nach langem Suchen nach einer geeigneten Entnahmetechnik glauben wir, in der beschriebenen Methode ein Verfahren gefunden zu haben, das es erlaubt, mit einfachen Mitteln grosse Blutvolumina sauber und sicher zu gewinnen, und das auch den Forderungen des Tierschutzes gerecht wird. Geringere Entnahmemengen sind unseres Erachtens unhandlich im Hinblick auf die verschiedenen anschliessenden Verfahrensschritte, und Punktionen der Ohrvenen mit Kanülen sollten mit Rücksicht auf das Tier nur zu Injektionszwecken verwendet werden; Blutentnahmen via Kanülen können das Entnahmevolumen aus verschiedenen Gründen, die jedem Experimentator geläufig sind, einschränken.

Spezifität Die hypophysären Glykoprotein-Hormone unterscheiden sich zwischenartlich in der Struktur ihrer α -Kette und innerartlich im Aufbau der β -Kette (siehe 1.). Obwohl kaum je mit Kontamination des Probengutes mit hypophysären Gonadotropinen anderer Herkunft als vom Schwein zu rechnen ist, erwies sich der Miteinbezug humaner und boviner Präparate in unsere Gegenüberstellung als aufschlussreich.

Während die beiden humanen Gonadotropine mit unserem Antiserum gegen porcines LH eine Relative Aktivität von weniger als 0.0001 aufwiesen, zeigte Rinder-LH eine Relative Aktivität von 0.04. Rinder- und Schweine-LH unterscheiden sich nicht bloss in ihren α -Ketten, sondern weichen auch im Aufbau ihrer biologisch wirksamen β -Kette voneinander ab. Bei beiden Tierarten umfasst die β -Kette zwar gleich viele, nämlich 119 Aminosäuren, doch stimmen an insgesamt 17 Stellen die Bausteine nicht überein. Damit besitzt die β -Kette des porcinen Luteinisierungshormons eine Struktur, die sich mehrfach von jener der β -Einheit des bovinen und ovinen LH's unterscheidet, deren Polypeptidketten - mit Ausnahme einer einzigen Abweichung an der Position 54 - identisch sind (36,37).

Das Ausmass der Verschiedenheit der α -Ketten zwischen ovinem, bovinem und porcinem LH scheint demgegenüber vergleichsweise gering: Nur an 4 Stellen innerhalb der α -Kette sind beim Schweine-LH andere Aminosäuren eingebaut als beim Rinder- und Schaf-LH; allerdings fehlt - im Vergleich zu bLH und oLH - in der porcinen α -Kette ein Hexapeptid an ihrem Aminoende. Welche Differenzen - jene zahlreichen innerhalb der β -Kette oder jene wenigen, zum Teil aber endständigen in der α -Kette - Anlass zu der festgestellten, deutlich unterschiedlichen Immunreaktivität führen, kann nur vermutet werden; endgültigen Aufschluss darüber könnten Studien mit den isolierten Untereinheiten selbst geben.

Für die Interpretation künftiger Bestimmungsergebnisse sind die Relativen Aktivitäten der arteigenen anderen Glykoproteine, pFSH und pTSH von Interesse. Hier zeigte sich (Abb. 9), dass die Hemmkurven für FSH und TSH nicht nur streng parallel zueinander und parallel zur LH-Kurve lagen, sondern dass FSH und TSH in jeder Konzentration zu einer beinahe identischen Verdrängung des LH-Tra-

cers geführt hatten. Geht man davon aus, dass sich LH, FSH und TSH innerhalb der Schweinespezies nur in der Struktur ihrer β -Ketten voneinander unterscheiden, daneben aber die gemeinsame α -Kette teilen, darf angenommen werden, dass die Rechtsverschiebung bei gewahrter Parallelität vorwiegend auf Variationen in der β -Kette, welche die biologische Wirksamkeit des Gesamtmoleküls determiniert, beruhen dürfte. Andererseits deutet der parallele Verlauf der dosisabhängigen Immunreaktivität darauf hin, dass für die gemeinsamen Relativen Aktivitäten auch gemeinsame antigene Determinanten und auf alle 3 Hormone ansprechende Antikörper-Bindungsstellen vorhanden sein müssen. Die Rechtsverschiebung wäre somit Ausdruck der Unterschiede in der β -Kette, die Parallelität Ausdruck der gemeinsamen α -Kette.

Schliesslich bleibt noch darauf hinzuweisen, dass die Distanz, um welche die Hemmkurven für FSH und TSH nach rechts verschoben sind, eine fehlerhafte Erfassung der LH-Konzentrationen sowohl unter physiologischen wie auch unter pathologischen Verhältnissen ausschliesst. Das in Abb. 9 vorgestellte Anti-pLH-Serum darf deshalb als hochspezifisch bezeichnet werden, und aus den vergleichenden Spezifitätsprüfungen erwachsen keine Vorbehalte bei der Interpretation der ermittelten LH-Konzentrationen.

5. Immunpräzipitation

5.1. Arbeitsbersicht

- 1) Da mit dem Zweiten Antikörper der von Kaninchen gewonnene Erste Antikörper gegen porcines LH präzipitiert werden soll, waren vorerst Immunglobuline (RGG) aus dem Serum nicht-immunisierter Kaninchen zu isolieren.
- 2) Mit den isolierten Immunglobulinen von Kaninchen wurden Schafe zur Antikörperproduktion stimuliert; diese Tierart erlaubt die Gewinnung ausreichender Serumvolumina.
- 3) Antiseren der Schafe gegen Immunglobuline von Kaninchen (ARGG-Seren), deren qualitative Prüfung ein befriedigendes Resultat ergeben hatte, wurden quantitativ untersucht, um ihre optimale Verdünnung für ihre Verwendung als präzipitierende Antiseren zu bestimmen.
- 4) Mit der geeigneten Arbeitsverdünnung des ARGG wurden die günstigsten Inkubationsbedingungen ermittelt.

2. Isolierung der Immunglobuline

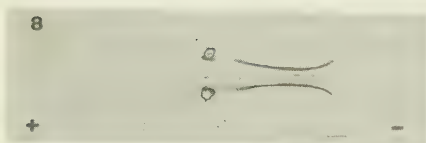
In Anlehnung an die von DEUTSCH (10) beschriebene Methode wurden die Immunglobuline aus dem Serum nicht-immunisierter Kaninchen (Anfangsvolumina 100-200 ml) mittels gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (R 8) isoliert. Nach sechsmaligem Ausfällen wurden die Präzipitate in Aqua bidest gelöst, während 12 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und anschliessend gefriergetrocknet.

Für die qualitative Beurteilung der Isolierungsprodukte (RGG) dienten die Ergebnisse aus der Immunelektrophorese der Präparate in Anwesenheit sowohl von Antiserum gegen Kaninchen-Vollserum (Anti-RS; R 14) als auch von Antiserum gegen Kaninchen-Gammaglobulin (ARGG; R 15) auf selbstgefertigten Agarplatten. Dabei wurden 20 µg des Antigens (= RG) in 2 µl NaCl physiol. während 75 Minuten bei 35 mA und 250 V in Veronalpuffer (P 5) elektrophoretisch aufgetrennt (L 12). Die anschliessende Immundiffusion gegen 50 µl rekonstituiertes Anti-RS bzw. ARGG dauerte 2 Stunden in der feuchten Kammer bei 4°C. Nach der Proteinfärbung mit Amidoschwarz (R 16) wurden die Präparate dreimal mit Spüllösung (R 9) ausgewaschen. Abbildung 10 zeigt das immunelektrophoretische Verhalten zweier verschiedener Isolierungsprodukte in Gegenwart von Anti-RS und ARGG.

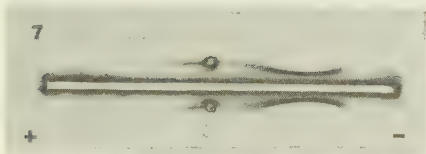
Abb. 10: Immunelektrophoretische Prüfung der isolierten RGG



a) Vollständiges immunelektrophoretisches Muster von normalem Kaninchenserum (NRS) mit Anti-RS als Referenz für die Beurteilung der mit RGG-Präparaten aufgetretenen Phänomene.



b) RGG-1 und ARGG:
Befund: Deutliche Präzipitationsbogen im Bereich der IgG.
Interpretation: RGG-1 enthält Immunglobuline.



c) RGG-1 und Anti-RS:
Befund: Präzipitate nur im Bereich der IgG.
Interpretation: RGG-1 darf als IgG von hohem Reinheitsgrad bezeichnet werden.



d) RGG-2 und ARGG:
Befund: Deutliche Präzipitationsbogen im Bereich der IgG.
Interpretation: RGG-2 enthält Immunglobuline.



e) RGG-2 und Anti-RS:
Befund: Präzipitate im Bereich der IgG, aber auch im Bereich der Hapto- und Makro-Globuline.
Interpretation: RGG-2 enthält vorwiegend IgG, ist jedoch mit anderen Globulinen kontaminiert.

5.3. Produktion des Zweiten Antikörpers, ARGG

5.3.1. Serumtiere

Als Serumtiere dienten 5 kastrierte Schafböcke, die zu Versuchsbeginn 8-14 Monate alt waren.

5.3.2. Immunisierungsverfahren

- Zusammensetzung der Antigenemulsion sowie Verabreichungsart sind aus Tabelle 8 ersichtlich. Das lyophilisierte Antigen wurde in einer Glasspritze in physiologischer NaCl gelöst, bevor Adjuvans und Arlachel A zugegeben wurde. Die Komponenten wurden in einem Virtis-Homogenisator (L 11) zu einer pastenartigen Emulsion gemischt, die man blasenfrei in eine zweite Injektionsspritze aus Glas transferierte.
- Vor der Grundimmunisierung wurden die Schafe mit 0.5 ml Rompun^R i.m. sediert und beidseits an der Seitenbrust und Flanke grossflächig geschoren.
- Die 1. Booster-Injektion erfolgte nach beobachtetem Titerabfall, jede spätere Injektion im Abstand von 10-12 Wochen.

Tabelle 8: Zusammensetzung und Verabreichungsart des Immunogens

Zweck	* RGG in mg	* NaCl physiol. in ml	* Adjuvans in ml	* Arlachel A in ml	Injektions- modus
Grund- Immunisierung	20	1.0	CFA 1.0	0.5	beidseits an je 50 Stellen intradermal
Booster Injektionen	20	1.0	IFA 1.0	0.5	beidseits an 8-10 Stellen subkutan

Anmerkungen: RGG = Rabbit Gammaglobulin; CFA = Complete Freund's Adjuvans (R11); IFA = Incomplete Freund's Adjuvans (R 11); Arlachel A = Neutrales Detergent (R 12); * = Angabe pro Tier.

5.3.3. Blutentnahme und Serumgewinnung

- Zeitplan: Von jedem Schaf wurde
 - . nach der Grundimmunisierung mehrmals im Abstand von 10 Tagen
 - . nach jeder Wiederholungsinjektion zwischen dem 10. und 12. Tag Blut entnommen
- Entnahmetechnik: Das Blut (nach Wiederholungsinjektionen 600 ml pro Schaf) wurde aus der Halsvene mit einer Pumpe (L 13) in vaselinisierte Auffanggefäße abgesogen (siehe Abbildung 11).
- Serumgewinnung: Das Blut liess man während 24 Stunden bei 4°C zur Fibrinbildung stehen. Nach dem Zentrifugieren wurde das Serum bei -20°C gelagert.

Abb. 11: Blutentnahme beim Schaf

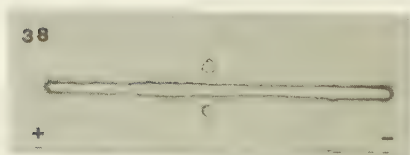


5.4. Qualitative Prüfung der ARGG-Seren

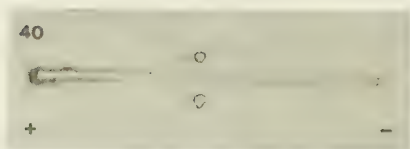
Zur qualitativen Beurteilung der Immunantwort wurden die Seren aus den ersten Blutentnahmen nach der Grundimmunisierung mittels Immunelektrophorese auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht (technische Angaben siehe unter 5.2.). Als Antigen diente das injizierte Immunogen (RGG-1 bzw. RGG-2), das man im Anschluss an seine elektrophoretische Auftrennung gegen die Antiseren aus verschiedenen Blutentnahmen diffundieren liess.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse aus der Immunelektrophorese mit Seren nach der Grundimmunisierung und Abbildung 13 analoge Resultate mit Seren nach der 1. Booster-Injektion.

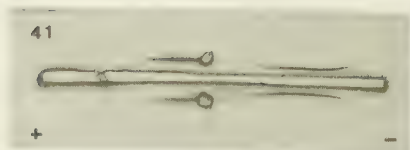
Abb. 12: Immunelektrophoretische Prüfung der ARGG-Seren nach der Grundimmunisierung



RGG-1 gegen Praeimmunserum 145/0: keine Präzipitate, da das Tier noch keinen Kontakt mit dem Antigen hatte.

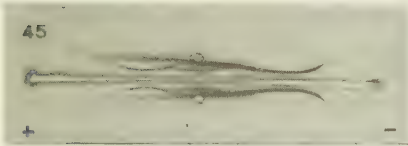


RGG-1 gegen ARGG 145/1, 10 Tage post inj.: Schwache Präzipitationsbogen im Bereich der IgG.

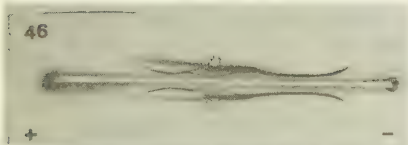


RGG-2 gegen ARGG 145/2, 20 Tage post inj.: Deutliche Präzipitationsbogen im Bereich der IgG.

Abb. 13: Immunelektrophoretische Prüfung der ARGG-Seren nach der
1. Booster-Injektion



RGG-2 gegen ARGG-72/5, 10 Tage post inj.: Stark ausgeprägte Präzipitationsbogen im Bereich der IgG, aber auch im Bereich der Makro- und Haptoglobuline



RGG-2 gegen ARGG-72/6, 20 Tage post inj.: Grundsätzlich gleiches Bild wie oben, im IgG-Bereich jedoch geringfügig schwächer ausgeprägt.

5.5. Quantitative Prüfung der ARGG-Seren

ARGG-Seren, die bei der qualitativen Prüfung kräftige Präzipitationsbogen gezeigt hatten, wurden in EDTA-PBS (P 6) 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 verdünnt, um von jedem Antiserum jene ARGG-Konzentration zu ermitteln, welche die im Reaktionsgemisch der 1. Inkubation (Hormon und 1. Antikörper) konstantgehaltene RGG-Menge möglichst vollständig zu präzipitieren vermag. Zur Festlegung dieser sog. "Äquivalenzzone" d.h. der sog. "optimalen Proportionen" von Antigen (= Anti-LH) und Antikörper (= ARGG) wurden Titrationskurven d.h. sog. "Heidelberger-Kurven" nach folgendem Muster erstellt:

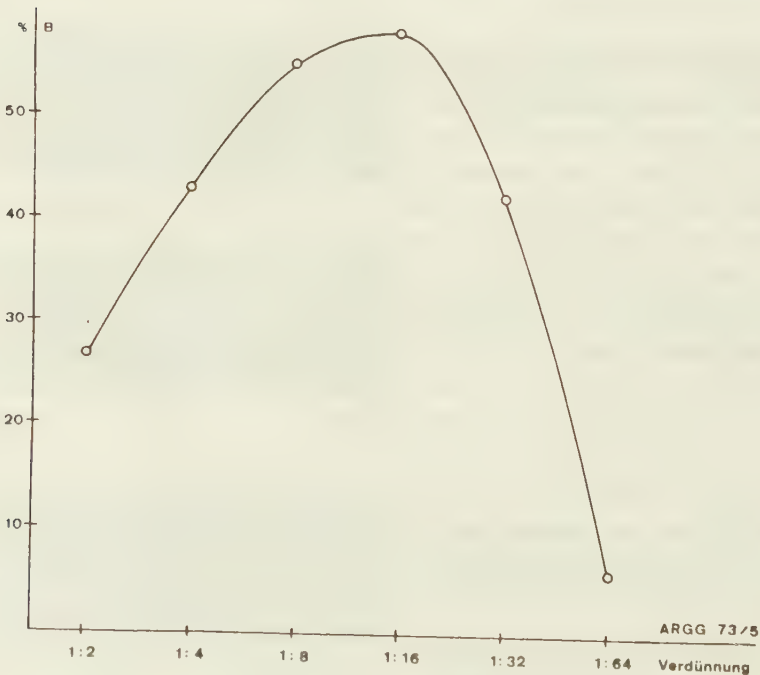
- 1) In der Ersten Immunreaktion wurden 500 μ l PBS-Gel (P4), 100 μ l Tracer und 200 μ l Anti-LH in Doppelwerten während 72 Stunden bei 4°C inkubiert. Diese Inkubate werden allgemein als "Bo", "Zero-Standard" oder "Tracer allein" bezeichnet.

Für die Arbeitslösung des Ersten Antikörpers wurde das Anti-LH in NRS 1:400 (P 7) verdünnt. Auf diese Weise wird - im

Hinblick auf die Präzipitationsreaktion - eine konstante Menge an RGG im Inkubat gewährleistet; zudem gestattet diese Verdünnungsart, dass dieselbe optimale Konzentration des 2. Antikörpers für beliebige Verdünnungen des 1. Antikörpers (auch anderer Hormone) verwendet werden kann, weil sie auf die RGG-Menge abgestimmt ist, die im NRS 1:400 (P 7) vorhanden ist.

- 2) Für die Präzipitationsreaktion (= zweite Inkubation) wurden den Bo-Inkubaten je 200 μ l der aufsteigenden ARGG-Verdünnungen beigelegt. Den Röhrchensatz stellte man vorerst für 24 Stunden in den Kühlschrank bei 4°C.

Abb. 14: Titration des zweiten Antikörpers (Anti-Kaninchen-Globulin)



- 3) Die Zweite Inkubation wurde dadurch beendet, dass man mit der Repetierspritze (L3) in jedes Inkubat 2.0 ml PBS-Gel gab und anschliessend die Röhrchen während 30 Minuten bei 4°C mit 1100 x g zentrifugierte.
- 4) Die Ueberstände wurden abgossen und die Radioaktivität der Präzipitate im Gammacounter (L8) gemessen.
- 5) Die cpm in den Präzipitaten wurden in Prozentsen des Totals (= Total der anfänglichen Radioaktivität in 100 µl Tracer) ausgedrückt und auf der Ordinate gegen die jeweilige ARGG-Verdünnung auf der Abszisse aufgezeichnet. Abbildung 14 zeigt eine derartige Titrationskurve ("Heidelberger-Kurve"). Als geeignete Arbeitslösung galt jene Verdünnung, welche die höchste Radioaktivitätsmenge zu präzipitieren vermochte.

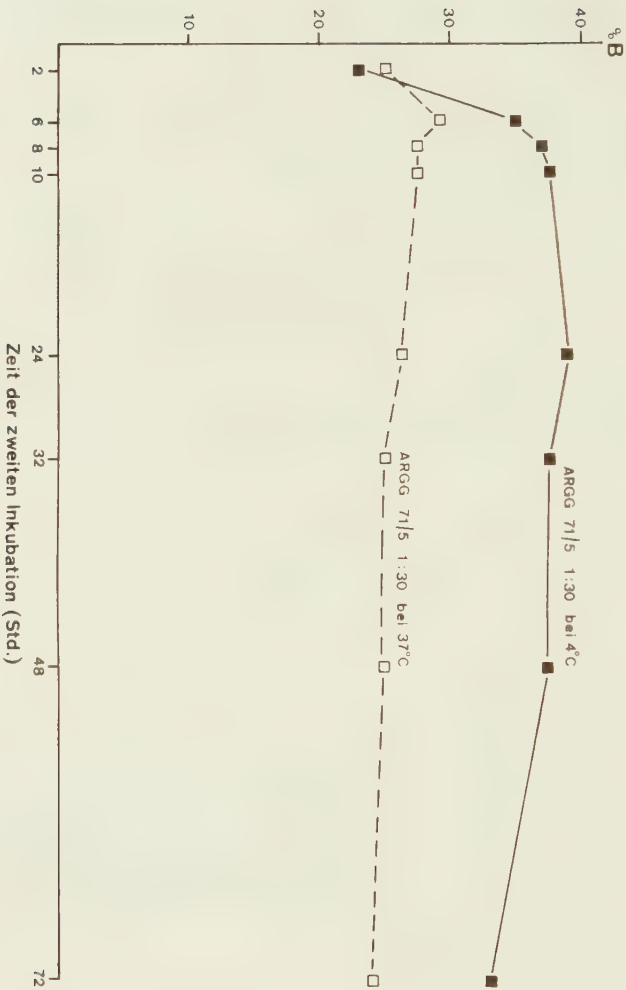
Bei der Betrachtung der Inkubationsröhrchen unmittelbar nach dem Zentrifugieren liessen sich die Präzipitate als tellerförmige, hauchdünne Beläge auf dem Röhrchenboden erkennen.

5.6. Inkubationsbedingungen

Verschiedene Antiseren gegen das gleiche Antigen können in mehrfacher Hinsicht unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, so dass die Inkubationsbedingungen den Eigenarten des jeweiligen Antiserums angepasst werden müssen. Im Falle der ARGG-Seren wurden die jedem Einzelserum eigenen optimalen Verhältnisse gefunden, indem man bei der Präzipitationsreaktion sowohl Temperatur als auch Dauer der Inkubation variierte.

Abbildung 15 zeigt die Abhängigkeit der präzipitierten Aktivitätsmenge von Temperatur und Dauer der Zweiten Inkubation mit dem ARGG-Serum 71/5 in einer als optimal ermittelten Arbeitsverdünnung von 1:30. Bei allen ARGG-Seren fand man analog zu diesem Beispiel einen steilen Anstieg der Präzipitatenmenge während der ersten 8-10 Inkubationsstunden: für die routinemässige Durchfüh-

Abb. 15: Prozentuale Bindung in Abhängigkeit der Zeit und der Temperatur
 (erste Inkubation 48 Std. bei 4°C mit Anti-PIH 1707/4 1:5'000)



rung der Bestimmungen wurde jene Inkubationsdauer gewählt, mit welcher im Bereich der Plateaubildung eine maximale Präzipitatenmenge erzielt werden konnte.

5.7. Diskussion

Das wesentlichste Kriterium, nach welchem sich die verschiedenen Radioimmunoassays unterscheiden, ist die Methode, mit der das freie Antigen vom antikörpergebundenen getrennt wird. Den zahlreichen Trennverfahren liegen eigene Prinzipien zugrunde, welche die Verlässlichkeit des Messystems zu beeinflussen vermögen, weil andere Substanzen als die in Frage stehenden im Trennschritt interferieren können.

Die Doppelantikörpertechnik bringt den Vorteil mit sich, dass sie bei allen Radioimmunoassays angewendet werden kann, nämlich sowohl für niedermolekulare Substanzen (z.B. Steroide) als auch für hochmolekulare Verbindungen (z.B. Glykoproteinhormone). Die Trennung mit dem Zweiten Antikörper eignet sich für jeden Ersten Antikörper von der gleichen Spezies (in unserem Falle Kaninchen) und für jedes Antigen. Im Routinelabor fällt insbesondere ins Gewicht, dass die Manipulationen dazu sehr wenig zeitintensiv sind (Dekantieren), und dass ganze Röhrchenserien als Ganzes verarbeitet werden können.

Allerdings sind zur Optimierung der Präzipitationsreaktion einige Kriterien zu beachten wie Ionenstärke, pH, relativ hohe Konzentrationen von Antigen und Antikörper, Temperatur und Dauer der Inkubation. Während die beiden erstgenannten Faktoren leicht konstant gehalten werden können, müssen die übrigen jedem neuen Antiserum wieder angepasst werden: Der Einfluss der Temperatur variiert mit jedem Antiserum, und die optimale Inkubationsdauer hängt stark von der Konzentration des 2. Antikörpers ab.

Obwohl es kaum möglich ist, die idealen Reaktionsbedingungen bis ins Letzte zu erfassen, bemühten wir uns, mit der beschriebenen Methode jenen Anforderungen zu genügen, welche für die Uebernahme des Bestimmungsverfahrens durch das Routinelabor zu erfüllen sind. Unter diesem Gesichtspunkt erwies sich auch die Zugabe von 2.0 ml PBS-Gel zum Inkubationsgemisch unmittelbar vor der Zentrifugation als vorteilhaft, weil sich damit ein nachfolgender Waschschrift erübrigt.

Eine letzte Bemerkung gilt der Ueberlegung, inwieweit der präzipitierende Antikörper die Spezifität des Systems beeinflussen kann. Wenn man davon ausgeht, dass Antikörper gegen Hormone nicht nur in den klassischen IgG, sondern auch in andern Serumproteinfraktionen wie IgA vorkommen können, dann ist es denkbar, dass die Assayspezifität zu einem gewissen Grad davon abhängt, welche der beiden Fraktionen im Gleichgewicht mit dem präzipitierenden Antikörper steht. Abklärungen zu dieser Erwägung sind uns keine bekannt.

6. Standard und Standardkurve

6.1. Prinzip

Werden exakt definierte LH-Mengen in zunehmenden Dosierungen mit konstanten Volumina an Tracer, Antiserum und präzipitierendem Antikörper inkubiert, so nimmt die Radioaktivität im präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplex im umgekehrten Sinne ab. Die Beziehung zwischen definierten LH-Mengen und der daraus resultierenden Aktivitäten wird graphisch als sog. Standardkurve dargestellt und entspricht ihrem Wesen nach einer "Dose-Response Curve" (1). Ihrerseits dient die Standardkurve dazu, den Hormongehalt einer Probe festzulegen, indem man die gefundene Probenaktivität einer Standarddosis zuordnet.

6.2. Inkubationsprogramm

Als Standard-Präparat dienten in unsern Arbeiten

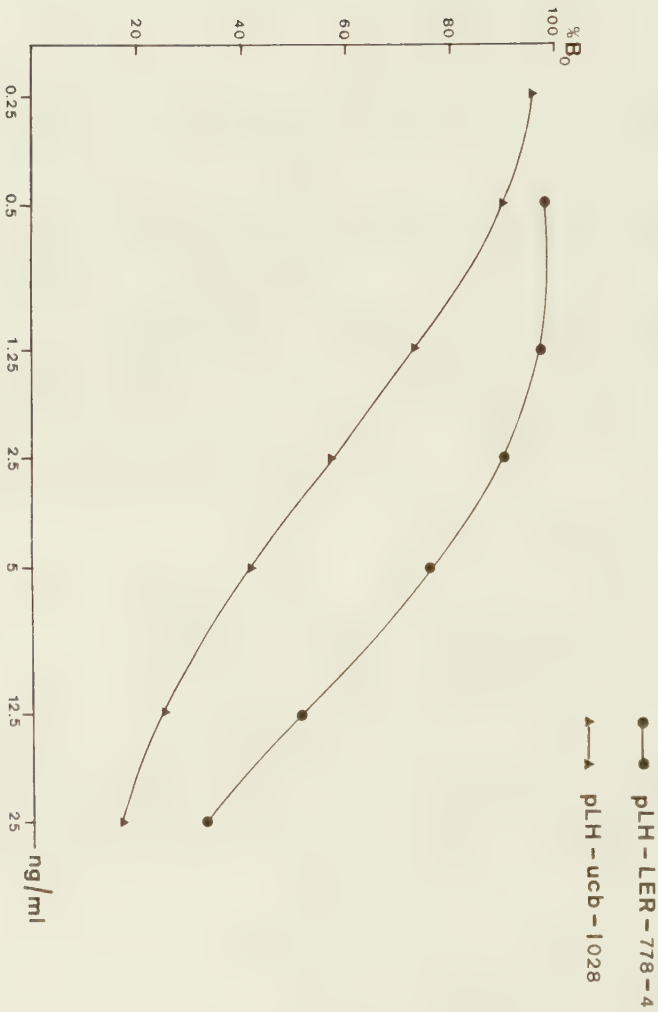
- pLH LER-778-4 mit 0.50 U NIH-LH S 1 /mg (R 17)
- pLH-ucb-1028 mit 1.2 U NIH-LH S 15 /mg (R 18).

Von beiden Präparaten stellten wir Arbeitslösungen mit folgenden Konzentrationen in PBS-Gel (P 4) her: 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 12.5 und 25.0 ng/ml. Das Inkubationsprogramm ist aus Tabelle 9 ersichtlich.

6.3. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 16 stellt 2 Standardkurven mit den beiden Präparaten einander gegenüber. Der Vergleich zeigt, dass das ucb-Präparat

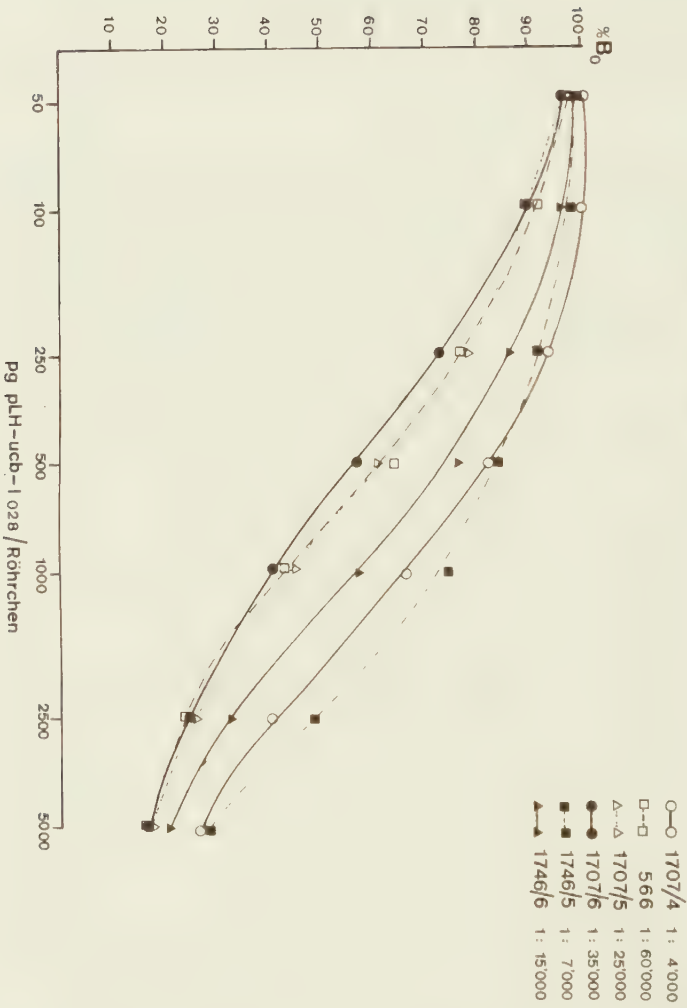
Abb. 16: Standardkurven mit verschiedenen Standards (Anti-PLH 1707/6)



eine deutlichere Verdrängung des markierten Hormons bewirkte als das LER-Präparat. Während bei dieser Studie dasselbe Antiserum eingesetzt worden war, verglichen wir in einer weiteren Untersuchung die Verhältnisse für das ucb-Präparat bei 6 verschiedenen Antiseren (Abb. 17), die bei der Titration einen ausreichenden Titer hatten erkennen lassen.

Der Radioimmunoassay als Spezifikation des Liganden-Assays hängt von der Avidität der Bindungsstelle am Antikörper zu einer (oder mehreren) spezifischen Konfiguration am Antigen (Ligand) ab; die Bindungsenergie ihrerseits hängt von den räumlichen Verhältnissen im Bindungsgefüge sowie von der Art der Bindungskräfte zwischen den beiden Passstellen ab. Jeder Unterschied im Aufbau des Bindungsortes am Antigen zwischen dem Standard und dem Molekül in der Probe oder - wie im hier zu diskutierenden Beispiel - zwischen zwei Standardpräparaten, aber auch jeder Unterschied zwischen der Struktur der Antigene und der komplementären Stellen am Antikörper, kann abweichende Werte für die jeweiligen Bindungskonstanten geben. Unterschiedliche Bindungsaffinitäten, sei es für die Substanz in der Probe und für die Standardsubstanz, oder aber - wiederum das Diskussionsbeispiel - für zwei verschiedene Standardpräparate führen zu auseinanderliegenden Assayresultaten. So betrachtet, waren divergierende Kurvenverläufe zu erwarten, da die beiden Präparate aus unterschiedlichen Extraktionsverfahren gewonnen worden waren und somit unterschiedliche Immunreaktivität aufweisen. Anders als bei chemisch und physikalisch engstens definierbaren Verbindungen (wie z.B. Steroidhormonen) liegt es bei Glykoproteinen in ihrer Natur begründet, dass kaum je ein Hypophysenextrakt erlangt werden kann, das voll und ganz mit den im Kreislauf vorkommenden Strukturen übereinstimmt, ganz abgesehen davon, dass auch diese im Laufe des individuellen Lebens gewissen Modifikationen unterworfen sind. Umso wichtiger ist es deshalb, dass bei jeder Konzentrationsangabe bei Glykoproteinen der zur Messung herangezogene Standard aufgeführt wird, damit die Be-

Abb. 17: Standardkurven mit verschiedenen Anti-PLH Seren



funde mindestens auf Immunreaktivitätsebene einigermaßen vergleichbar mit Ergebnissen aus andern Laboratorien werden.

6.4. Vorinkubation

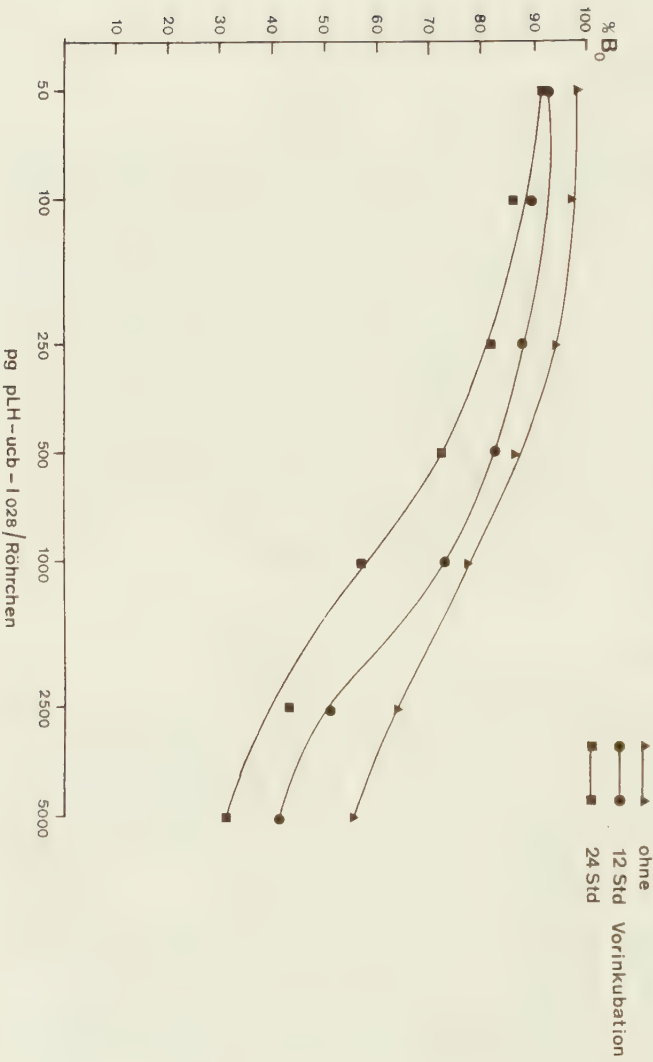
In Fortführung der vorangehenden Ueberlegungen erschien es uns sinnvoll, den Effekt einer Vorinkubation auf die Empfindlichkeit des Assays zu studieren. Unter Vorinkubation verstanden wir eine Reaktion von Standard oder Serumprobe mit dem ersten Antikörper während 12 oder 24 Stunden, bevor das markierte Antigen zugefügt wird (65). HALES and RANDLE (20) erwähnten unseres Wissens als Erste das Phänomen, dass eine derartige Vorinkubation die Empfindlichkeit im Radioimmunoassay zu erhöhen vermochte.

Abbildung 18 legt deutlich dar, dass auch in unserer Messanlage die Empfindlichkeit durch Vorinkubation erhöht werden kann. Gestützt auf diese Erfahrung führten wir für alle weiteren Ansätze eine Vorinkubation von 24 Stunden bei 4°C durch.

6.5. Serumeffekt

Die Beziehungen zwischen Standard Dosen und der jeweiligen Radioaktivität im Antigen-Antikörperkomplex dürfen nur dann in umgekehrter Richtung für die Zuweisung einer Hormonmenge zur gemessenen Radioaktivität in einer Testprobe verwendet werden, wenn die qualitative Zusammensetzung der Einzelinkubate innerhalb der Standardkurve und jene der Probeninkubate gleich ist, oder aber wenn nachgewiesen werden kann, dass vorhandene konstitutionelle Unterschiede ohne interferierende Wirkung auf die Immunreaktion sind. Im vorliegenden Fall, in dem die Standardinkubate ohne Serumzusatz vorlagen, die Seruminkubate aber neben dem zu messenden LH alle übrigen Serumkomponenten enthielten (Direktinkubation),

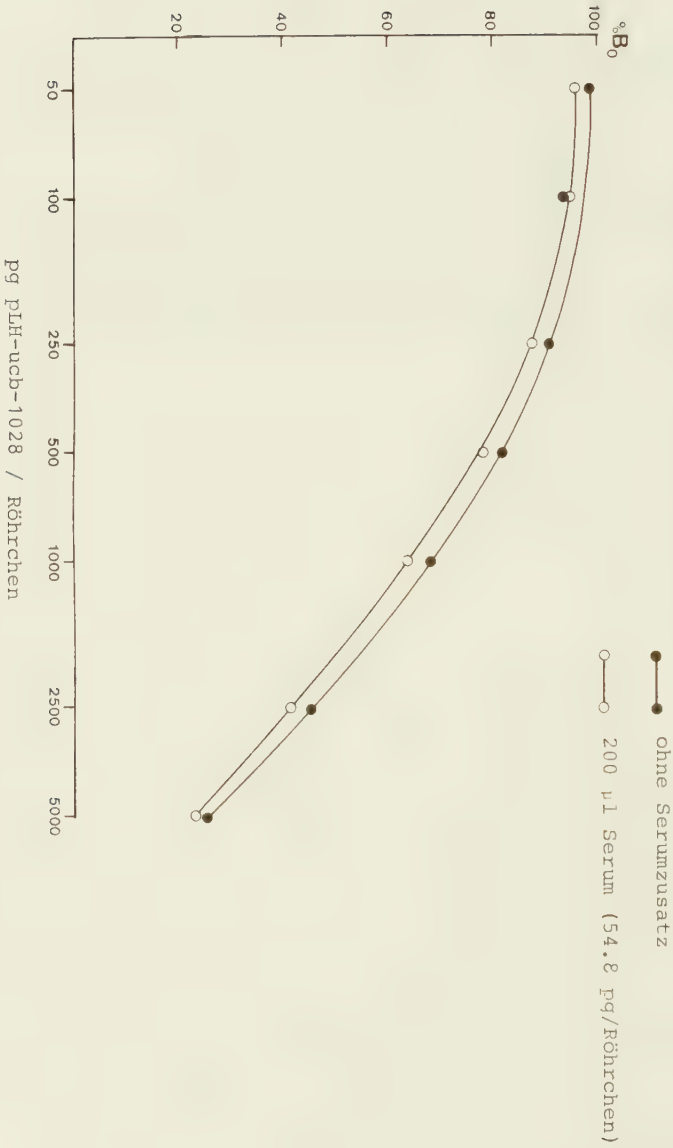
Abb. 18: Einfluss der Vorinkubation auf die Standardkurven (Anti-PLH 1707/6)



war es deshalb nötig, einen möglichen "Serumeinfluss" zu untersuchen. Die unter 8.2. angeführten Befunde schlossen das Bestehen eines Serumeinflusses weitgehend aus. Trotzdem prüften wir die Möglichkeit eines Serumeinflusses, indem wir 2 Standardkurven inkubierten, von denen die eine statt 300 μ l PBS-Gel nur 100 μ l Puffer pro Röhrchen, dafür 200 μ l eines Serums mit minimaler LH-Konzentration [54.8 pg / 200 μ l] enthielt. Das genannte Serum wurde von einem gestagenbehandelten Schwein gewonnen.

Abbildung 19 stellt die beiden Standardkurven dar. Die Parallelität ihres Verlaufes liefert den Beweis, dass ein Serumeffekt besteht, dessen Ausmass jedoch vernachlässigt werden kann und unseres Erachtens keinen Zusatz von Serum zur Standardkurve erfordert.

Abb. 19: Serumeinfluss auf die Standardkurve



7. I n k u b a t i o n s a b l a u f i m R o u t i n e - v e r f a h r e n

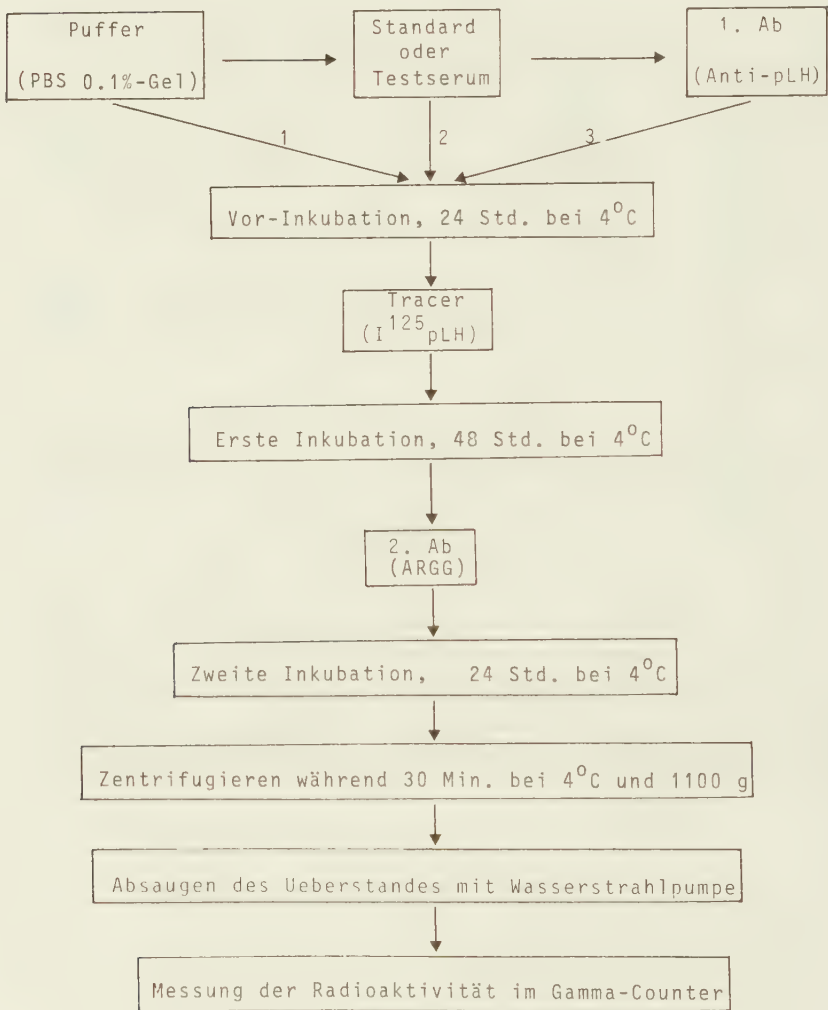
Abbildung 20 zeigt in Form eines Flussdiagrammes den Arbeitsablauf bei der routinemässigen Durchführung des Radioimmunoassays und enthält auch die für jeden Schritt als optimal befundene Zeitdauer. Sämtliche Standard- und Testproben wurden im Doppel angesetzt. Die Proben wurden im Glasröhrchen zu 5 ml (L 14) inkubiert. Für grössere Inkubationen (ab 30 Röhrchen) wurde die Pipettierstation (L 15) benützt, bei kleineren Inkubationen benützten wir Konstriktionspipetten aus Glas (L 9).

Tabelle 9 orientiert über die Reagenzienvolumina und deren Zugabefolge. Vor Beginn jeder Inkubation werden die Röhrchen einzeln vortexiert.

Für die Radioaktivitätsmessung benützten wir einen Gammazähler (L 8); der eingebaute Computer errechnet - nach Subtraktion der Impulse im Blank (= NSB) von jenen in den Testproben - die Konzentration des Hormons in ng/ml. Abbildung 21 zeigt ein Beispiel eines Datenblattes, wie es vom Rechner ausgedruckt wurde.

Dieser Arbeitsablauf unter Verwendung der genannten Apparate gestattet ein weitgehend automatisiertes Verarbeiten grosser Probenzahlen. Menschliche Fehlerquellen werden auf ein Minimum reduziert; die erforderliche Präsenzzeit kann und muss auf eine Intensivüberwachung des gesamten Messsystems verwendet werden.

Abb. 20: Arbeits- und Zeitverlauf des RIA



Tab. 9: Inkubationsprogramm für den RIA

Probe-Nr.	Bezeichnung	Puffer in / μ l	Standard od. Test- plasma/ μ l	1. Ab in / μ l	Tracer in / μ l	2. Ab in / μ l
1,2	Total	---	---	---	100	---
3,4	Blank (NSB = non specific binding)	700	---	---	100	200
5,6	Refr (B_0)	500	---	200	100	200
7,8	0.025 ng (200 μ l von 0.125 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
9,10	0.05 ng (200 μ l von 0.25 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
11,12	0.1 ng (200 μ l von 0.5 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
13,14	0.25 ng (200 μ l von 1.25 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
15,16	0.5 ng (200 μ l von 2.5 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
17,18	1.0 ng (200 μ l von 5.0 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
19,20	2.5 ng (200 μ l von 12.5 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
21,22	5.0 ng (200 μ l von 25.0 ng/ml PBS 0.1% Gel)	300	200	200	100	200
23-n	Unbekannte = 200 μ l Plasma	300	200	200	100	200

Proben 1 - 22 : Standardkurve

Proben 23 - n : zu bestimmende Plasmen

Abb. 21: Daten-Printout

```

A RIA 01
POS CODE TIME COUNT1 CF41 %
0001 TOTA 0060 020215 20175 7
0002 0000 0060 020121 20081 7
      20128
0003 BLAN 0060 000471 431 4.6
0004 0000 0060 000523 483 4.4
      * 457
0005 REFR 0060 009711 9214 1.0
0006 0000 0060 009937 9440 1.0
      9327
0007 .125 0060 009718 9221 1.0
0008 0000 0060 009706 9209 1.0
      9215
0009 0.25 0060 009595 9098 1.0
0010 0000 0060 009463 8966 1.0
      9032
0011 0.5 0060 009088 8591 1.0
0012 0000 0060 008564 8067 1.1
      8329
0014 0000 0060 008377 7880 1.1
      7880
0015 2.5 0060 007768 7271 1.1
0016 0000 0060 008149 7652 1.1
      7462
0017 5 0060 006503 6006 1.2
0018 0000 0060 006542 6045 1.2
      6026
0019 12.5 0060 004708 4211 1.5
0020 0000 0060 004593 4006 1.5
      4109
0021 25 0060 002716 2219 1.9
0022 0000 0060 002751 3154 1.7
      * 2687
PARAMETER GROUP ->01
KARLOVICH ID ->
0060 TIME (SEC)->
900000 MAX COUNTS ->
0040 BACKGROUND ->
01 VOLUME(1-4)->
0001 FIRST POS. ->
02 REPL. (1-3)->
12345 PRINT(1-8)->
POS CODE POS CODE
0001 TOTA
0003 BLAN
0005 REFR
0007 .125
0009 0.25
0011 0.5
0013 1.25
0015 2.5
0017 5
0019 12.5
0021 25
0023 UNKS
0000 0000
02 METHOD(1-7)->
12345 EPRINT(1-8)->
05 MAX. DEV. % ->

```

Fortsetzung Abb.21

	CPM
BLAN	457.0
REFR	9327.0
TOTA	20128.0

	CONC	B/B0
STD01	.125	.988
STD02	.250	.968
STD03	.500	.893
STD04	1.250	.845
STD05	2.500	.800
STD06	5.000	.646
STD07	12.500	.440
STD08	25.000	.288

B/B0 E 00

```

1.20I
I
I
1.00I
I
I
.96I*
I
I*
.84I *
I
I *
.72I
I
I *
.60I
I
I
.48I
I
I *
36I
I
I
24I
I
I
12I
I
I
00I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----
00 30 60 90 120 150 180 210 240 270

```

POS	CODE	TIME	COUNT1	CPM1	%	RATIO	CONC.
0023	UNKS	0060	007944	7447	1.1	.798	2.525
0024	0090	0060	007281	6784	1.2	.727	3.679
			7116			.763	3.102

8. Gültigkeit des Bestimmungsverfahrens

Von den Seite 16 erwähnten 3 Gruppen von Informationen, die zur vollständigen Charakterisierung eines Radioimmunoassays notwendig sind, wurde die Erste (exakte und ausführliche Beschreibung aller im Messverfahren verwendeten Reagenzien und Hilfsmittel) in den vorangehenden Kapiteln zweckbezogen abgehandelt und in den Anhängen 1-3 aufgelistet.

Die Untersuchungen über die Spezifität wurden im Kapitel 3 eingehend dargelegt und die Ergebnisse diskutiert, so dass hier noch auf die 3. Gruppe, auf die Verfahrensparameter eingegangen werden muss.

8.1. Empfindlichkeit

Unter der Empfindlichkeit der Standardkurve versteht man die kleinste Antigenmenge, die sich bei einem Vertrauensintervall von 95% signifikant von B_0 (0-Standard) unterscheidet (1).

Für die Ermittlung der Empfindlichkeit wurden die Durchschnittswerte der B_0 -Doppelbestimmungen aus 10 Standardkurven mit jenen der unteren Standardkonzentrationen in einem t-Test zweier voneinander unabhängiger Mittelwerte verglichen. Dabei fand man, dass bei einer LH-Konzentration von 0.025 ng/Röhrchen die Nullhypothese im 5%-Bereich abgelehnt werden konnte, so dass die Empfindlichkeit der Standardkurve bei 0.025 ng/Röhrchen liegt.

8.2. Genauigkeit

Die Genauigkeit einer Messmethode ist ein Mass für die Uebereinstimmung zwischen dem gemessenen Wert und der "wahren", effektiv in der Probe vorhandenen Substanzmenge. Die Genauigkeit wird üblicherweise so ermittelt, dass radioimmunologisch bestimmte Werte

mit gravimetrischen Ergebnissen verglichen werden (19). In diesen Wiederauffindungsversuchen (1, 69) setzten wir einem Plasma mit bekanntem niedrigem LH-Gehalt exakt definierte, zunehmende LH-Mengen zu (Tab. 10) und bestimmten in je 5 Inkubationen die Wiederauffindung der zugegebenen Hormonmengen. Für die Berechnung wurde der Mittelwert [ng/ml] der Röhrchen 23 und 24, welche das Plasma mit bekannter LH-Menge (ohne zusätzliche LH-Beigabe) enthielten, von den Mittelwerten aus den nachfolgenden Röhrchen subtrahiert. Bei einer absoluten Genauigkeit müssten die zugefügten Hormonmengen exakt wiedergefunden werden. Die tatsächlichen Werte wurden in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: Inkubationsprogramm zur Bestimmung der Genauigkeit

Nr.	Bezeichnung	Puffer [µl]	Plasma [µl]	Standard [µl]	Alle übrigen Dosierungen
1-22	Standardreihe				
23,24	Plasma + 0	300	200	200	
25,26	0.25 ng/ml	100	200	200	
27,28	0.5	100	200	200	
29,30	1.25	100	200	200	wie Tab.9
31,32	2.5	100	200	200	
33,34	5.0	100	200	200	
35,36	12.5	100	200	200	
37,38	25.0	100	200	200	

Tabelle 11: Wiederauffindung bekannter LH-Mengen

Zugegebene Hormonmenge [ng/ml]	Gemessene Werte nach Subtraktion der LH-Menge im Plasma ohne zusätzliches LH in 5 Inkubationen [ng/ml]				
0.25	0.23	0.42	0.26	0.19	0.23
0.5	0.59	1.00	0.40	0.66	0.55
1.25	1.23	1.89	1.71	1.73	1.10
2.5	1.60	2.89	2.26	2.68	2.58
5.0	4.53	5.46	5.35	5.67	5.15
12.5	13.30	12.30	13.70	14.66	12.10
25.0	24.57	25.70	22.70	25.20	22.90

Abbildung 22 zeigt die Regressionsgerade, wie sie sich aus einer einfachen Regressionsanalyse obiger Werte darstellt. Bei idealer Übereinstimmung würde der Korrelationskoeffizient 1 betragen; der aus unsern Berechnungen gefundene Korrelationskoeffizient betrug 0.99.

8.3. Präzision

Die Präzision ist ein Mass für den Grad der Abweichungen von Endwerten mehrerer Einzelbestimmungen derselben Probe (19, 55, 69) und umfasst sinngemäss zwei Parameter:

Intra-Assay-Variabilität: Aussagen über die Präzision von Bestimmungen innerhalb des gleichen Inkubationsansatzes können anhand des Variationskoeffizientes gemacht werden, der aus den Endwerten mehrerer Bestimmungen der gleichen Probe berechnet wird. Von je einem Plasmapool mit niedrigem bzw. hohem LH-Gehalt wurden je 10 Doppelbestimmungen durchgeführt, was die folgenden Werte für die Intra-Assay-Variabilität ergab:

Pool I : $\bar{x} = 3.14 \pm 0.13$ ng/ml; $v[\%] = 4.15$

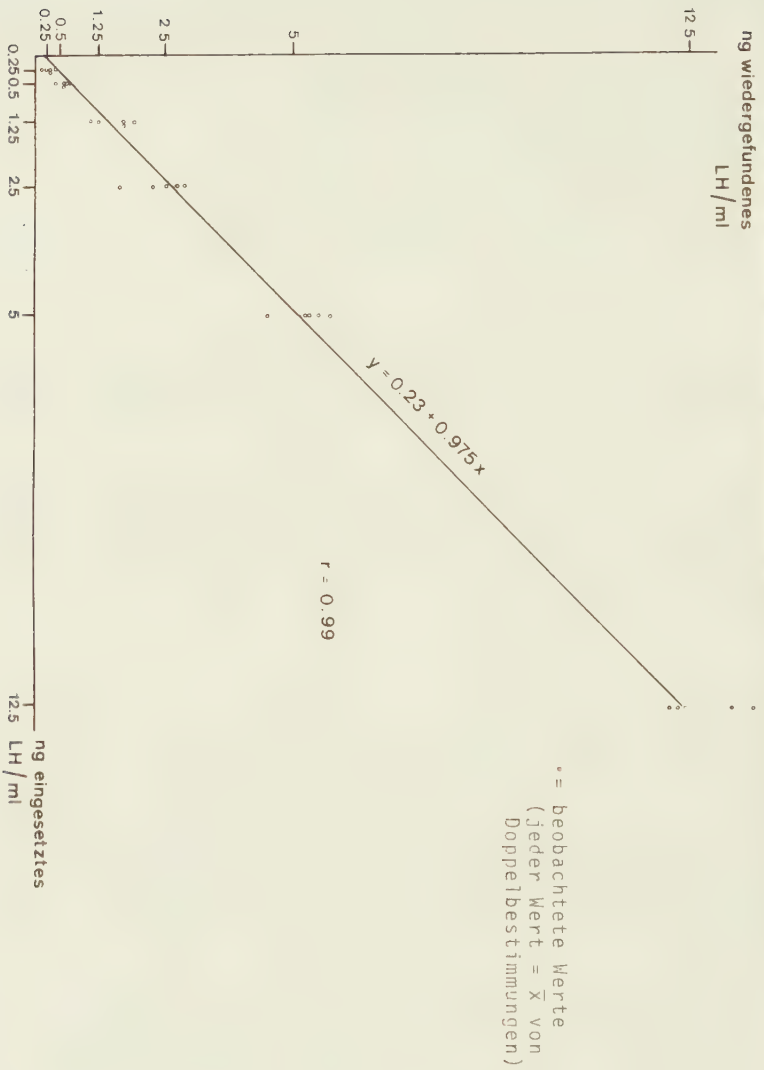
Pool II : $\bar{x} = 10.58 \pm 0.52$ ng/ml; $v[\%] = 4.94$

Inter-Assay-Variabilität: Um Hinweise darüber zu erhalten, welche Unterschiede in den Endwerten einer Bestimmung bestehen, wenn die Probe in zwei oder mehreren Inkubationsansätzen analysiert wird, wurde von je 2 Plasmen in 10 verschiedenen Inkubationen der LH-Gehalt gemessen. Aus den Endwerten berechnete man wiederum den Variationskoeffizienten und konnte damit die Inter-Assay-Variabilität charakterisieren:

Pool I : $\bar{x} = 3.28 \pm 0.51$ ng/ml; $v[\%] = 15.64$

Pool II : $\bar{x} = 8.61 \pm 1.29$ ng/ml; $v[\%] = 14.93$

Abb. 22: Zusatz von bekannten Hormonmengen zu Serum (Bestimmung der Genauigkeit)



9. Anwendungsbeispiel

Um die verlässliche Anwendbarkeit des erarbeiteten Radioimmunoassays für porcines LH zu belegen, stellten wir uns die Aufgabe, den Verlauf der LH-Konzentrationen während einer normalen Rausche festzuhalten.

Einem 8 Monate alten Schwein, das vor Versuchsbeginn bereits 2 Rauschen gezeigt hatte, wurde ein Teflonkatheter nach der von ELLENDORFF et al. (14) beschriebenen Methode in die V.jugularis externa implantiert. Eine Woche vor der zu erwartenden Brunst begannen wir mit täglichen Blutentnahmen; während der Rausche wurde in 1-stündigen Intervallen Blut gewonnen. Die Einzelvolumina (5 ml) wurden in heparinisierte Röhrchen aufgefangen und sofort zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abgehebert und bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert. Aus den Plasmen wurden die Konzentrationen von pLH, Progesteron und Cortisol (43) bestimmt.

Die Laborbefunde wurden im Zusammenhang mit den klinischen Symptomen dargestellt, und zwar das LH-Profil gesondert in Abbildung 23 und die Verläufe von Progesteron, Cortisol und LH gesamthaft in Abbildung 24.

Das LH-Profil wird charakterisiert durch einen während des ganzen Prooestrus anhaltenden niederen LH-Spiegel und durch einen steil ansteigenden und abfallenden Peak am Ende der Rausche. Bringt man dieses Bild in Zusammenhang mit den äusseren Brunstsymptomen, so stellt man fest, dass die Anzeichen der Vorrausche (Rötung und Schwellung der Vulva) mindestens bei diesem einen Tier etwa 48 Stunden vor der massiven LH-Ausschüttung auftraten. Zwischen der ersten Duldungsbereitschaft und dem LH-Anstieg verstrichen nochmals 12 Stunden.

Aus diesem Einzelfall können selbstverständlich keine allgemeingültigen Rückschlüsse auf die Verhältnisse im Ablauf endokriner und klinischer Geschehnisse während der Rausche gezogen werden, ebensowenig lassen sich verbindliche Vergleiche mit bereits vor-

Abb. 23: LH-Konzentrationen im Blutplasma während der Rausche (Sau Nr. 8480)

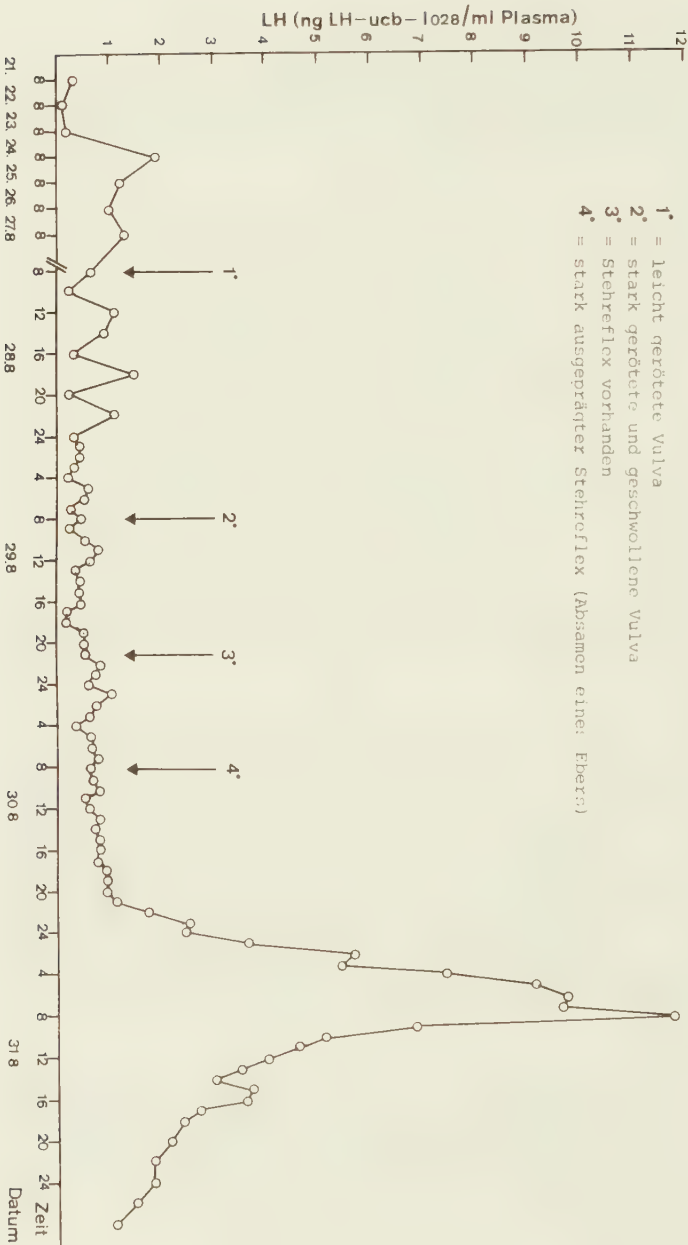
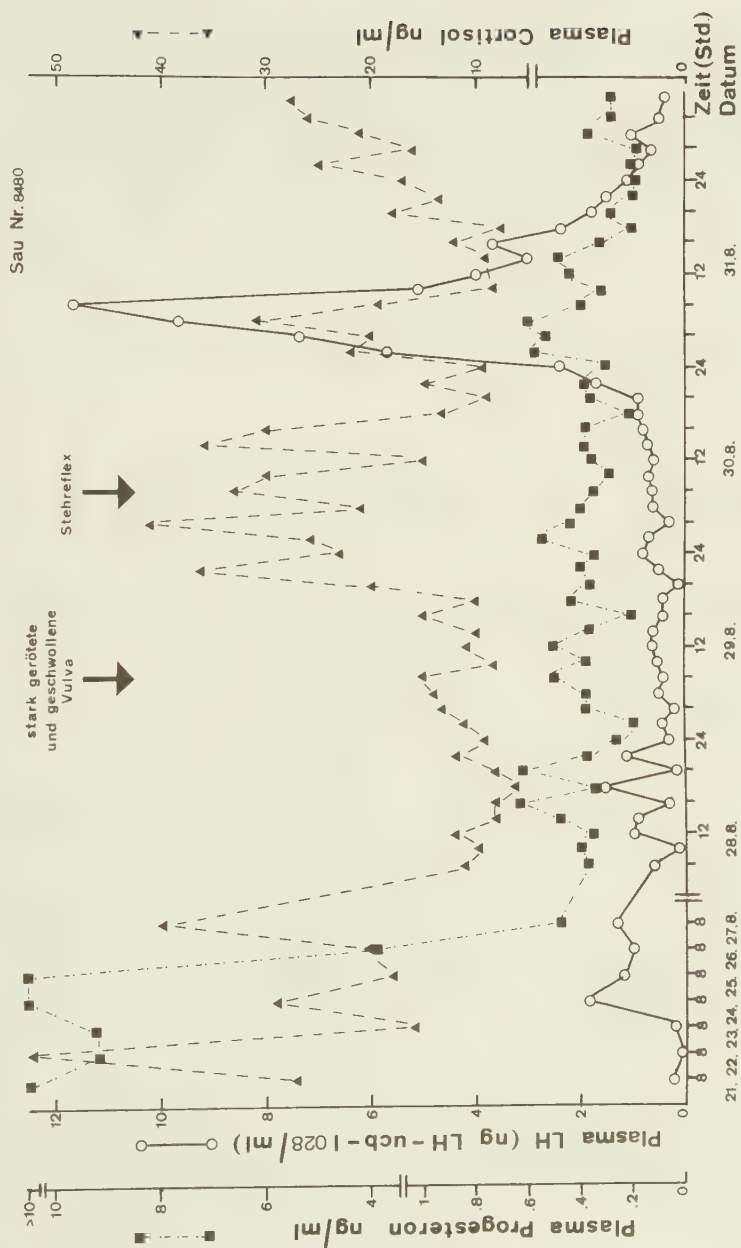


Abb. 24: LH, Progesteron und Cortisol Konzentrationen im Plasma während der Pausche



handenen Literaturangaben anstellen. Einzig NISWENDER et al. (48) und HENRICKS et al. (22) haben den LH-Verlauf während der Rausche verfolgt, allerdings ebenfalls eher im Sinne eines Anwendungsbeispiels für den von ihnen entwickelten RIA. Ihre Versuche umfassten zwar mehrere Schweine, aber den klinischen Brunstsymptomen wurde wenig Beachtung geschenkt. Selbst die gefundenen Konzentrationen können nicht vorbehaltlos mit unseren Befunden verglichen werden, weil je verschiedene LH-Präparate zur Immunisierung bzw. zur Jodierung und als Standard verwendet wurden. In beiden Arbeiten fällt jedoch auf, dass die beim Schwein erreichten Spitzenwerte beträchtlich unter jenen liegen, die allgemein für Schafe oder Rinder genannt werden.

Die von uns ermittelten Peak-Konzentrationen liegen absolut gesehen um einen Faktor 1.5 - 2 höher als jene der genannten Arbeitsgruppen (22, 48). Dasselbe trifft zu bei einem Vergleich mit den von PARVIZI et al. (49) und POMERANTZ et al. (52) mitgeteilten Befunden; einzig die Werte von RAYFORD et al. (53) liegen wesentlich unter jenen aller andern in diesem Zusammenhang genannten Autoren. Vergleichende Betrachtungen sind nur nach sorgfältigem Studium der Analysenmethoden und der zur Markierung, Stimulierung des Antiserums und Herstellung der Standardlösungen verwendeten Präparate zulässig. Dass derartige Vorbehalte nicht nur sinnvoll, sondern geradezu zwingend sind, geht aus Abb. 16 hervor: In unseren Bestimmungen bedienten wir uns aus erwähnten Ueberlegungen des ucb-Präparates als Standardsubstanz. Die gleiche Radioaktivitätsmenge im Endpunkt der Bestimmung ergäbe - würde sie mit der LER-778-4-Kurve ermittelt - einen niedrigeren LH-Gehalt bezogen auf dieses Standardpräparat. Die Forderung nach einer detaillierten Beschreibung eines Messverfahrens (19) hat ihre Berechtigung, was in diesem Beispiel klar zum Ausdruck kommt.

Die dargelegte Anwendungsmöglichkeit lässt erkennen, dass sich der erarbeitete RIA für porcines LH zur Erfassung der LH-Fluktuationen im peripheren Kreislauf eignet, indem er sowohl im unteren

wie oberen Konzentrationsbereich geringe Unterschiede aufzulösen vermag. Es ist zu erwarten, dass mit diesem analytischen Hilfsmittel die beim Schwein im Vergleich zum Rind bislang wenig untersuchten endokrinologischen Verhältnisse eingehender studiert werden, damit das Verständnis für die arteigenen Besonderheiten der normo- und pathophysiologischen Vorgänge bei dieser Spezies vertieft werden kann.

10. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein homologer Radioimmunoassay für Schweine-LH beschrieben. Die benutzten Methoden und Reagenzien sowie deren Bereitstellung wurden mit allen technischen Einzelheiten im Sinne einer Laborvorschrift festgehalten. Die Gründe für die jeweilige Wahl eines Vorgehens wurden diskutiert.

Ausgangsmaterial für die Markierung mit ^{125}I unter der Wirkung von Chloramin-T war das Hypophysenextrakt LER-786-3. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das immunreaktive, radiojodierte LH mittels Säulenchromatographie über Sephadex G-75 gewonnen. Die Antiseren gegen porcines LH wurden nach multipler intradermaler Grundimmunisierung und subkutanen Booster-Injektionen von Kaninchen gewonnen und auf Titer und Spezifität geprüft. Der LH-Antikörper-Komplex wurde in einer Präzipitationsreaktion mit Anti-Kaninchen-Gammaglobulin, dessen Produktion bei Schafen stimuliert worden war, vom freien Hormon getrennt.

Nach Vorliegen der optimalen Dauer und Temperatur für die erste und zweite Immunreaktion wurden die Gültigkeitskriterien des Bestimmungsverfahrens für ein Antiserum festgelegt, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

Kurzbeschreibung der Gültigkeitskriterien im RIA für Schweine-LH mit dem Antiserum 1707/6

Empfindlichkeit:	0.025 ng / Röhrchen
Genauigkeit:	Korrelationskoeffizient $r = 0.99$
Präzision:	
Intra-Assay-Variabilität:	$\bar{x} = 3.14 \pm 0.13 \text{ ng/ml}; v[\%] = 4.15$ $\bar{x} = 10.58 \pm 0.52 \text{ ng/ml}; v[\%] = 4.94$
Inter-Assay-Variabilität:	$\bar{x} = 3.28 \pm 0.51 \text{ ng/ml}; v[\%] = 15.64$ $\bar{x} = 8.61 \pm 1.29 \text{ ng/ml}; v[\%] = 14.93$
Spezifität: Relative Aktivität	pLH 1.00 bLH 0.043 pFSH 0.016 pTSH 0.012 hLH < 0.0001 hFSH < 0.0001

Das erarbeitete Bestimmungsverfahren wurde im Sinne eines Anwendungsbeispiels dazu benützt, bei einem Schwein die LH-Konzentrationen während der Rausche zu erfassen. Die aufgezeichneten Hormonprofile (LH, Progesteron und Cortisol) lassen erkennen, dass der beschriebene Radioimmunoassay für Schweine-LH ein wertvolles Hilfsmittel darstellt, um im Routinelabor die bisherigen Hormonanalysen in verschiedenen Fragestellungen sowohl beim weiblichen wie auch beim männlichen Schwein zu ergänzen.

11. Literature

- 1) ABRAHAM G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials.
Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol.II, 3-29; International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974.
- 2) ALBERT A.: A clinical bio-assay for chorionic gonadotropin.
J Clin Endocr 8, 619-620, 1948.
- 3) AMIR S.M.: Dissociation of glycoprotein hormones (A review of recent studies of their subunits).
Acta endocr (Kbh.) 70, 21-34, 1972.
- 4) AUST D.: Versuche zur Bestimmung des gonadotropen Hormones ICSH im Blutplasma vom Rind.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1966.
- 5) BOLTON A.E. and Hunter W.M.: The labelling of proteins of high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent.
Biochem J 133, 529-539, 1973.
- 6) BOSCH A.M.G., van Hell H., Brands J. and Schuurs A.H.V.M.: Specificity, sensitivity and reproducibility of enzyme-immunoassays.
Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs; Symposium am 10. und 11. Juli 1978 in Ulm. Hersg. S.B. Pal; Walter de Gruyter + Co, Berlin, 1978.
- 7) BUTT W.R.: The iodination of follicle stimulating and other hormones for radioimmunoassay.
J Endocr 55, 453-454, 1972.
- 8) CATT K.J., Dufau M.L. and Tsuruhara T.: Studies on a radioligand receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin.
J Clin Endocr Metab 32, 860-863, 1971.
- 9) CATT K.J., Dufau M.L. and Tsuruhara T.: Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin.
J Clin Endocr 34, 123-132, 1972.
- 10) DEUTSCH H.F.: Preparation of immunoglobulin concentrates.
Methods in immunology and immunochemistry. Edt. C.A. Williams and M.W. Chase; Academic Press, New York, San Francisco, London, 1967. Vol I, 315-321.
- 11) DICZFALUSY E., Holmgren H.J. and Westman A.: The action of human chorionic gonadotrophin preparations on the adrenals and testicles of hypophysectomized immature rats.
Acta endocr (Kbh.) 5, 45-53, 1950.
- 12) DIEKMANN M.A.: Quantitation of receptors for luteinizing hormone in the ovine corpus luteum.
Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA, 1978.

- 13) DUFAU M.L., Pock R., Neubauer A. and Catt K.J.: In vitro bio-assay of LH in human serum: The rat interstitial cell testosterone (RICT) assay.
J Clin Endocr Metab 42, 958-969, 1976.
- 14) ELLENDORFF F. and Pomerantz D.K.: Methode zur kontinuierlichen stressfreien Blutentnahme beim Schwein.
Dtsch tierärztl Wschr 79, 261-288, 1972.
- 15) GLOVER J.S., Salter D.N. and Shepherd B.P.: A study of some factors that influence the iodination of ox insulin.
Biochem J 103, 120-128, 1967.
- 16) GRAESSLIN D., Leidenberger F.A., Lichtenberg V., Glismann D., Hess N., Czygan P.J. and Bettendorf G.: Existence of big and little forms of luteinizing hormone in human serum.
Acta endocr (Kbh.) 83, 466-482, 1976.
- 17) GREENWOOD F.C., Hunter W.M. and Glover J.S.: The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radio-activity.
Biochem J 89, 114-123, 1963.
- 18) GREEP O., Van Dyke H.B. and Chow B.F.: Gonadotropins of swine pituitary. Various effects of purified Thylakentrin (FSH) and pure Metakentrin (ICSH).
Endocrinology 30, 635-649, 1942.
- 19) HAFS H.C., Niswender G.D., Malven P.V., Kaltenbach C.C., Zimbelman R.G. and Condon R.J.: Guidelines for hormone radio-immunoassays.
J Anim Sci 46, 927-928, 1977.
- 20) HALES C.N. and Randle P.J.: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate.
Biochem J 88, 137-146, 1963.
- 21) HELMKAMP R.W., Conteras M.A. and Bale W.F.: ^{131}I -labelling of proteins by the method of iodine monochloride.
Int J appl Rad Isotopes 18, 737-746, 1967.
- 22) HENRICKS D.M., Guthrie H.D. and Handlin D.L.: Plasma estrogens, progesterone and luteinizing hormone levels during estrous cycle in pigs.
Biology of Reproduction 6, 210-218, 1972.
- 23) HOLNESS D.H. and Hunter R.H.F.: Postpartum oestrus in the sow in relation to the concentration of plasma oestrogens.
J Reprod Fert 45, 15-20, 1975.
- 24) HUNTER W.M. and Greenwood F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature (Lond.) 194, 495-496, 1962.
- 25) HUNTER W.M.: Preparation and assesement of radioactive tracers.
Brit med Bull 30, 18-23, 1974.

- 26) HURN B.A.L. and Landon J.: Antisera for radioimmunoassay. European workshop, 15-17 September 1970 Edinburgh. Edt. K.E. Kirkham and W.M. Hunter; Churchill Livingstone Verlag, Edinburgh and Lond., 1971.
- 27) JACOBS H.S. and Lawton N.F.: Pituitary and placental glycopeptide hormones. Brit med Bull 30, 55-61, 1974.
- 28) JANSSEN S. and Loeser A.: Hypophysenvorderlappenpulver and Ovarium. Arch Exp Pathol Pharmacol 151, 188-196, 1930.
- 29) JEFFCOATE S.L.: Purification of ^{125}I -LH by cellulose adsorption chromatography. Radioimmunoassay methods. European workshop, 15-17 September 1970 Edinburgh. Edt. K.E. Kirkham and W.M. Hunter; Churchill Livingstone Verlag, Edinburgh and London, 1971.
- 30) JENSEN H., Simpson M.E., Tolksdorf S. and Evans H.M.: Chemical fractionation of the gonadotropic factors present in sheep pituitary. Endocrinology 25, 57-62, 1939.
- 31) JOSHI U., Raghavan V., Zemse G., Sheth D., Borkas P.S. and Ramachandran S.: Use of "Penicillinase" in the estimation of human chorionic gonadotropin and human placental lactogen by enzyme-linked immunoassays. Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, Symposium am 10. und 11. Juli 1978 in Ulm. Hersg. S.B. Pal; Walter de Gruyter + Co, Berlin, New York, 1978.
- 32) KHAN F.S. and Saxena B.B.: Use of purified gonadotropin receptor in the development of an enzyme receptor assay (ERA) for luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (HCG). Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs. Symposium am 10. und 11. Juli 1978 in Ulm. Hersg. S.B. Pal; Walter de Gruyter + Co, Berlin, New York, 1978.
- 33) KUENZLE C.C. and Doebeli M.: Insolubilized Lactoperoxidase for the (^{125}I)-labelling of proteins. Experientia 29, 800-801, 1973.
- 34) LEIDENBERGER F. and Reichert L.E.jr.: Evaluation of a rat testis homogenate radioligand receptor assay for human pituitary LH. Endocrinology 91, 901-909, 1972.
- 35) LEIDENBERGER F.A., Willascheck R., Pahnke V.G. and Reichert L.E.jr.: Application of a radioligand receptor assay for determination of luteinizing hormone in human serum. Acta endocr (Kbh.) 81, 54-72, 1976.
- 36) MAGHUIN-ROGISTER G., Combarnous Y. and Hennen G.: The primary structure of the porcine luteinizing-hormone α -subunit. Eur J Biochem 39, 255-263, 1973.

- 37) MAGHUIN-ROGISTER G. and Hennen G.: Luteinizing hormone: The primary structures of the β -subunit from bovine and porcine species.
Eur J Biochem 39, 235-253, 1973.
- 38) MARCHALONIS J.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.
Biochem J 113, 299-305, 1969.
- 39) McDONALD L.E.: Veterinary endocrinology and reproduction. 2nd ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1975.
- 40) McFARLANE A.S.: Efficient trace-labelling of proteins with iodine.
Nature (Lond.) 182, 53, 1958.
- 41) MIDGLEY A.R.jr., Rebar R.W. and Niswender G.D.: Radioimmunoassay employing double antibody techniques.
Immunoassay of gonadotropins, Symposium 23-25 September 1969, Stockholm; ed. E. Diczfalusy, Bogtrykkeriet Forum, Copenhagen, 1970; p 247-256.
- 42) MORATO-MANARO J., Cervino J.M. and Maggiolo J.: A method of determining interstitial-cell-stimulating hormone in urine: some results in normal and pathological cases.
J Ciba Found Coll Endocr 12, 238-250, 1960.
- 43) MURPHY B.P., Engelberg W. and Pattee C.J.: Simple method for the determination of plasma corticoids.
J Clin Endocr Metab 23, 293-300, 1963.
- 44) MYIACHI Y., Vaitukaitis J.L., Nieschlag E. and Lipsett M.B.: Enzymatic iodination of gonadotrophins.
J Clin Endocr Metab 34, 23-28, 1972.
- 45) NEILL J.D., Dailey R.A., Tsou R.C. and Reichert L.E.jr.: Immunoreactive LH-like substances in serum of hypophysectomized and praepuberal monkeys: inactive in an in vitro LH-bioassay.
Endocrinology 100, 856-861, 1977.
- 46) NISWENDER G.D., Reichert L.E.jr., Midgley A.R.jr. and Nalbandow A.V.: Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone.
Endocrinology 84, 1166-1173, 1969.
- 47) NISWENDER G.D. and Midgley A.R.jr.: Hapten-radioimmunoassay of steroids.
Immunologic methods in steroid determination. Ed. F.G. Peron and B.V. Caldwell; Worcester Foundation for Experimental Biology, Appleton Century Crofts, New York, 1970.
- 48) NISWENDER G.D., Reichert L.E.jr. and Zimmermann D.R.: Radioimmunoassay of serum levels of luteinizing hormone throughout the estrous cycle in pigs.
Endocrinology 87, 576-580, 1970.

- 49) PARVIZI N., Elsaesser F., Smidt D. and Ellendorff F.: Plasma luteinizing hormone and progesterone in the adult female pig during the estrous cycle, late pregnancy and lactation, and after ovariectomy and pentobarbitone treatment.
J Endocr 69, 193-203, 1976.
- 50) PINTO H., Wajchenberg B.L., Zazuco O.H., Torres de Toledo e Souza I., Schmidt R.W. and Pieroni R.R.: Preparation of high-quality iodine-125-labelled pituitary luteinizing hormone for radioimmunoassay.
Clin Chim Acta 60, 125-135, 1975.
- 51) PINTO H., Lerario A.C., Torres de Toledo e Souza I., Wajchenberg B.L., Mattar E. and Ribeiro Pieroni R.: Preparation of high quality iodine-125-labelled pituitary human follicle-stimulating hormone (hFSH) for radioimmunoassay: comparison of enzymatic and Chloramin-T iodination.
Clin Chim Acta 76, 25-34, 1977.
- 52) POMERANTZ D.K., Ellendorff F., Elsaesser F., König A. and Smidt D.: Plasma LH changes in intact adult, castrated adult and pubertal male pigs following various doses of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH).
Endocrinology 94, 330-335, 1974.
- 53) RAYFORD P.L., Brinkley H.J. and Young E.P.: Radioimmunoassay determination of LH concentration in the serum of female pigs.
Endocrinology 88, 707-713, 1971.
- 54) REUTER A.M., Bricmont Y., Tixhan C. and Franchimont P.: Comparative evaluation of various labelling techniques.
In: Protides of the biological fluids. 24th Colloq., Bruges 1975. Pergamon Press, Oxford, 1976.
- 55) REUTER D.M., Ketelslegers J.M., Hendrick J.C. and Franchimont P.: Radioimmunoassay of protein hormones: principles and methodology.
Hormone Res 9, 404-421, 1978.
- 56) ROLLAG M.D., Myers D., Osteryoung J. and Niswender G.D.: Radioiodination of protein hormones using a constant potential thin-layer electrochemical cell.
J Nucl Biol Med 19, 80-85, 1975.
- 57) ROSA U., Scassellati G.A., Pennisi F., Riccioni N., Giagnoni P. and Giordani R.: Labelling of human fibrinogen with ^{131}I by electrolytic iodination.
Biochim Biophys Acta 86, 519-526, 1964.
- 58) SAMOLS E. and Williams H.S.: Trace labelling of insulin with iodine.
Nature (Lond.) 190, 1211-1212, 1961.
- 59) THORELL J.I. and Johansson B.G.: Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity.
Biochim Biophys Acta 251, 363-369, 1971.

- 60) VAITUKAITIS J.L., Robbins J.B., Nieschlag E. and Ross G.T.: A method of producing specific antisera with small doses of immunogen.
J Clin Endocr Metab 33, 988-991, 1971.
- 61) VAITUKAITIS J.L., Ross G.T., Reichert L.E.jr. and Ward D.N.: Immunologic basis for within and between species cross-reactivity of luteinizing hormone.
Endocrinology 91, 1337-1342, 1972.
- 62) VAN CAUWENBERGE H. and Franchimont P.: Assay of protein and polypeptide hormones.
1st ed., Pergamon Press, Oxford, 1970.
- 63) VAN DAMME M.-P., Robertson D.M. and Diczfalusy E.: An improved in vitro bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse leydig cell preparations.
Acta endocr (Kbh.) 77, 655-671, 1974.
- 64) VAN HALL E.V., Vaitukaitis J.L., Ross G.T., Hickmann J.W. and Ashwell G.: Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance of immunoreactive HCG from Plasma in Rats.
Endocrinology 89, 11-15, 1971.
- 65) WIDE L., Nillius S.J., Gemzell C. and Roos P.: Radioimmunosorbent assay of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum and urine from men and women.
Acta endocr (Kbh.) Suppl 174, 7-58, 1973.
- 66) YALOW R.S. and Berson S.A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature (Lond.) 184, 1648-1649, 1959.
- 67) YALOW R.S. and Berson S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J Clin Invest 39, 1157-1175, 1960.
- 68) YALOW R.S.: Heterogeneity of peptide hormones: its implications for radioimmunoassay.
Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol I; Symposium 10-14 September 1973 Istambul; International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974.
- 69) ZAZUCO HIGA O., Torres de Toledo e Souza I., Wajchenberg B. L., Pinto H. and Ribeiro Pieroni R.: Standardization of radioimmunoassay technique for determination of plasma insulin and growth hormone.
Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol I; Symposium 10-14 September 1973 Istambul; International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974.

Anhang 1 : Puffer - Zusammensetzung - Herstellung

P 1 : Natriumphosphat-Puffer, 0.5 M, pH 7.5

160 ml NaH_2PO_4 . 1 H_2O [60g/L], Merck-Nr.6346

840 ml Na_2HPO_4 . 2 H_2O [89g/L], Merck Nr.6580

Der pH wurde unter pH-Meter-Kontrolle exakt eingestellt.

P 2 : Natriumphosphat-Puffer, 0.05 M, pH 7.5

100 ml Natriumphosphat-Puffer, 0.5 M, pH 7.5 (P 1)
ad 1000 ml Aqua bidest.

P 3 : PBS - Phosphate Buffered Saline, 0.01 M, pH 7.0

245.5 g NaCl (Merck-Nr.6404)

11.8 g NaH_2PO_4 . 1 H_2O (Merck-Nr.6346)

39.7 g Na_2HPO_4 . 2 H_2O (Merck-Nr.6580)

3.0 g Merthiolat (Fluka-Nr.71230)

ad 30 L Aqua bidest.

P 4 : PBS-Gel

10 g Gelatine (Difco, Detroit, Mich., USA)
ad 10 L PBS, 0.01M, pH 7.5 (P 3)

P 5 : Barbital-Puffer, 0.1 M, pH 8.6

4.45 g Barbitursäure (Merck-Nr.186)

20.6 g Barbitursäure-Natriumsalz (Merck-Nr.6318)
ad 1000 ml Aqua bidest.

Der pH wurde unter pH-Meter-Kontrolle eingestellt.

P 6 : EDTA-PBS, 0.05 M, pH 7.0

18.6 g EDTA (Titriplex III, Merck-Nr.8418)
ad 1000 ml PBS, 0.01 M, pH 7.0 (P 3)

Der pH wurde unter pH-Meter-Kontrolle eingestellt.

P 7 : NRS, Normal Rabbit Serum 1:400 in EDTA-PBS

5.0 ml Normales Kaninchenserum (Institut für Zuchthygiene)
ad 2000 ml EDTA-PBS, 0.05 M, pH 7.0 (P 6).

P 8 : Barbital-Puffer, 0.05 M, pH 8.6

5.0 ml Barbital-Puffer, 0.1 M, pH 8.6 (P 5)
ad 100 ml Aqua bidest.

Anhang 2 : Reagenzien - Zusammen - setzung - Herstellung

R 1 : pLH LER-786-3

Bezugsquelle: Prof. Leo E. Reichert, Jr.; Emory University,
School of Medicine, Dept. of Biochemistry,
Woodruff Memorial Building, Atlanta,
Georgia 30322, USA.

Aktivitätsgehalt: 0.65 NIH-LH-S₁ U/mg.

Arbeitslösung: 1 µg/µl Aqua bidest.
Portioniert in Einzeldosen zu 5 µl in
Steampullen zu 1 ml. Lagerung bei -20°C

R 2 : Chloramin-T-Lösung [2 mg/ml]

20 mg Chloramin-T (Merck-Nr.2426)
ad 10 ml Natriumphosphatpuffer, 0.5M, pH 7.5 (P 1)
Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

R 3 : Natriumdisulfit-Lösung [2 mg/ml]

20 mg Natriumdisulfit (Merck-Nr.6528)
ad 10 ml Natriumphosphatpuffer, 0.05M, pH 7.5 (P 2)
Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

R 4 : Transfer-Lösung [1% Kaliumjodid, 16% Sucrose, Bromphenolblau]

1.0 g Kaliumjodid, Merck-Nr.5043
16.0 g Scrose, Fluka-Nr.84100
1 Spatelspitze Bromphenolblau, Fluka-Nr.18040
ad 100 ml Aqua bidest.

Die Transferlösung wurde in Portionen zu 0.5 ml bei -20°C
gelagert.

R 5 : Na¹²⁵J

Lieferant: Eidg. Institut für Reaktorforschung, CH-5303
Würenlingen.
Liefermenge: 2 mCi/0.004 ml (Code I-A-11).

R 6 : Sephadex^R G-75

Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Vertretung: Pharmacia-pdf-(Schweiz) AG, Drahtzugstr.18,
8034 Zürich.

R 7 : HSA [0.25%], Humanes Serumalbumin

125 mg HSA (Sigma 9511-A)

ad 50 ml Barbitalpuffer, 0.05 M, pH 8.6 (P 8).

R 8 : Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung, pH 7.0

- 500 g Ammoniumsulfat (Merck-Nr.1217)
werden durch stetes Rühren während 2 Std. bei 90°C in
500 ml Aqua bidest gelöst.
- Nach dem Abkühlen auf 20°C wurde die überstehende Ammo-
niumsulfat-Lösung auf pH 7.0 eingestellt.

R 9 : Spüllösung für IEP

45 Teile 2700 ml Methanol (Merck-Nr.6009)

10 Teile 600 ml Eisessig (Merck-Nr.63)

45 Teile 2700 ml Aqua bidest.

R 10 : Zellulosepulver

Whatman CF 11 (W. & R. Balston Ltd., England)

R 11 : Freund'sches Adjuvans, komplett / inkomplett

Difco, Detroit, Milch, USA.

R 12 : Arlacel A

Atlas-Goldschmidt GmbH, Söllingstr. 120, Essen, BRD.

R 13 : Pentobarbital-Lösung [50 mg/ml]

100 g Pentobarbital-Natriumsalz (Pentobarbital Natrium
PhH VI; Art.-Nr.197 110 der Firma Siegfried AG,
CH-4800 Zofingen).

18 g NaCl (Merck-Nr.6404)
200 ml Aethanol (Merck-Nr.983)
ad 2000 ml Aqua bidest.

R 14 : Antiserum gegen Kaninchen-Vollserum (Anti-RS)

Polyvalent antiserum GAR/ielfo, Kat.-Nr.3-478;
Nordic Immunological Laboratories, Tilburg-Berchem-London.

R 15 : Antiserum gegen Kaninchen-Gammaglobulin (ARCG)

Goat antibody to rabbit γ -Globulin, Kat.-Nr.539 844;
Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, California, USA.

R 16 : Amidoschwarz-Lösung

9 g Amidoschwarz (Merck-Nr.1167)
1500 ml Spüllösung (R 9)

R 17 : pLH LER-778-4

Bezugsquelle: Wie R 1
Aktivitätsgehalt: 0.50 U NIH-LH S-1 / mg

R 18 : pLH-ucb-1028

Bezug: ucb S.A., Bioproducts, Peptide Department,
Rue Berkendael 68, B-1060 Bruxelles
Aktivitätsgehalt: 1.2 U NIH-LH S-15 / mg

Anhang 3: Laborhilfsmittel-Apparate

L 1 : Automatischer Fraktionensammler

LKB 7000 UltroRac

Lieferant: Werner Meyer AG, Zihlmattweg 1, Postfach,
CH-6000 Luzern 13.

L 2 : Polystyrolröhrchen zu 5 ml mit rundem Boden

Lieferant: Milian Instruments SA., Bd. Helvétique 26,
CH-1207 Genève; Katalog-Nr. TPS-75.

L 3 : Repetierspritze zu 5 ml, CORNWALL

Lieferant: Becton, Dickinson AG, Leimenstrasse 3,
CH-4002 Basel; Katalog-Nr. 3054.

L 4 : Glove Box

Lieferant: Eidg. Institut für Reaktorforschung,
CH-5303 Würenlingen

L 5 : Hamilton-Spritzen mit einzementierter Nadel

10 µl	Katalog-Nr. 701-N
25 µl	702-N
50 µl	705-N
100 µl	710-N

Lieferant: Hamilton-Werk, CH-7402 Bonaduz

L 6 : Chromatographiesäule K 15/30 Pharmacia

Lieferant: Pharmacia-pdf-(Schweiz) AG,
Drahtzugstrasse 28, Postfach, CH-8034 Zürich

L 7 : Peristaltikpumpe VARIO-PERPEX II

Lieferant: Werner Meyer AG, Zihlmattweg 1, Postfach,
CH-6000 Luzern 13

L 8 : Gammacounter, LKB Rack Gamma II

Lieferant: Werner Meyer AG, Zihlmattweg 1, Postfach,
CH-6000 Luzern 13

L 9 : Konstriktionspipetten aus Glas

Lieferant: H.E. Pedersen, 7 Sommerstedgade,
DK-1718 Copenhagen V.

L 10: TOYO Chromatography Paper No.514

Lieferant: Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd., Houchi, Nihombashi,
Chuo-Ku, Tokyo.

L 11: Virtis-Homogenisator Virtis 45

Lieferant: Kontron-Analytik, Bernerstrasse-Süd 169,
CH-8048 Zürich

L 12: Immunelektrophorese-LKB-Gelman-Ausrüstung

Katalog-Nr.51 446

Lieferant: Werner Meyer AG, Zihlmattweg 1, Postfach,
CH-6000 Luzern 13

L 13: Vakuumpumpe Reciprotor Typ 506 R

Lieferant: N. Zivy & Cie., S.A., Mühlemattstr. 7, Postfach 412
CH-4104 Oberwil-Basel.

L 14: Corning-Reagenzgläser aus Pyrex-Borosilicate, 12 x 75 mm

Katalog-Nr.99445 bzw. 4.987.71

Lieferant: Digitana AG, Burghaldenstr. 11, Postfach,
CH-8810 Horgen.

L 15: Pipettierstation Ultralab LKB-2071

Lieferant: Werner Meyer AG, Zihlmattweg 1, Postfach,
CH-6000 Luzern 13.

Herrn Prof. Dr. K. Zerobin danke ich für die Ueberlassung des Themas sowie für die finanzielle Unterstützung, die er mir gewährt hatte.

Herrn Dr. M. Döbeli (Institut für Zuchthygiene) bin ich für gründliche Einarbeitung und unermüdliche Betreuung zu besonderem Dank verpflichtet.

Frau Dr. J. Lunow (Institut für Zuchthygiene) danke ich für all die wertvollen Diskussionen sowie Herrn Dr. E. Eggenberger (Institut für Zuchthygiene) für die Beratung in statistischen Fragen.

Dankbar gedenke ich aller Mitarbeiter des Instituts für Zuchthygiene, die mir in irgendeiner Weise bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit hilfreich zur Seite standen, insbesondere Frau E. Straumann für die sorgfältige Reinschrift.

CURRICULUM VITAE

25.12.1955	in Bogotá (Kolumbien) geboren
1959-1961	Kindergarten in Bogotá
1961-1966	Primarschule in Bogotá
1966-1967	Primarschule in Wittenbach SG / Schweiz
1967-1971	Mittelschule in Appenzell / Schweiz
1971-1973	Mittelschule in Bogotá (kolumbianischer Mittelschulabschluss)
1976	Eidg. Maturitätsprüfung
1973-1978	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
Herbst 1978	Staatsexamen als eidg. dipl. Tierarzt
1978-1980	Doktorand am Institut für Zuchthygiene (Prof. Dr. K. Zerobin) der Universität Zürich.

